

Entwicklung von Vektor-basierenden Impfstrategien für die prophylaktische Immunisierung im Friend-Retrovirus-Modell

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Nadine Bongard
aus Wuppertal
August 2017

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Dittmer

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. J. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Retroviren..... | 1 |
| 1.1.1 Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)..... | 1 |
| 1.1.2 Friend Virus (FV)..... | 4 |
| 1.2 Herpes Viren | 6 |
| 1.2.1 Cytomegalievirus (CMV)..... | 7 |
| 1.3 Impfstoffe | 9 |
| 1.3.1 HIV-Impfstoffe..... | 10 |
| 1.3.2 FV-Impfstoffe..... | 12 |
| 1.4 Zielsetzung | 14 |
| 2 Material | 16 |
| 2.1 Chemikalien | 16 |
| 2.2 Geräte | 18 |
| 2.3 Enzyme..... | 19 |
| 2.4 Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 2.5 Standardlösungen und Puffer | 20 |
| 2.6 Medien..... | 23 |
| 2.7 Antibiotika..... | 24 |
| 2.8 Oligonukleotide | 24 |
| 2.9 Labor-Kits | 24 |
| 2.10 Plasmide | 25 |
| 2.11 Sonde | 25 |
| 2.12 Bakterienstämme | 26 |
| 2.13 Zellen..... | 26 |
| 2.14 Viren..... | 26 |
| 2.15 Größenstandards..... | 26 |
| 2.16 Mausstämme..... | 27 |
| 2.17 Antikörper | 27 |
| 2.18 Fluoreszenzmarkierte Antikörper und Tetramere | 27 |
| 2.19 Peptide | 28 |
| 2.20 Datenbanken..... | 28 |
| 2.21 Software | 29 |
| 3 Methoden..... | 30 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden..... | 30 |
| 3.1.1 Oligonukleotiddesign | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2 Polymerase Kettenreaktion | 30 |
| 3.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten | 31 |
| 3.1.4 Herstellung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen..... | 32 |
| 3.1.5 Ligation | 32 |
| 3.1.6 Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen | 33 |
| 3.1.7 Plasmid Isolation (Mini-Prep)..... | 33 |
| 3.1.8 DNA Präparation über Cäsiumchlorid-Gradienten | 33 |
| 3.1.9 Konzentrationsbestimmungen von DNA Lösungen | 34 |
| 3.1.10 Sequenzierung | 34 |
| 3.1.11 Isolierung von Bacmid-DNA | 34 |
| 3.2.12 Southern-Blot Analyse der MCMV-Bacmid-Mutanten | 35 |
| 3.2 Proteinbiochemische Methoden | 35 |
| 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen | 35 |
| 3.2.2 Western Blot..... | 36 |
| 3.3 Zellbiologische Methoden..... | 37 |
| 3.3.1 Erhaltende Zellkultur..... | 37 |
| 3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 37 |
| 3.4 Virologische Arbeiten | 37 |
| 3.4.1 Rekonstitution von MCMV-Viren aus Bacmid-DNAs | 37 |
| 3.4.3 Herstellung eines gereinigten MCMV-Stocks | 38 |
| 3.4.4 Titration von MCMV | 38 |
| 3.5 Immunologische Methoden..... | 39 |
| 3.5.1 DNA-Vakzinierung | 39 |
| 3.5.2 MCMV-Vakzinierung | 39 |
| 3.5.3 Belastungsinfektion mit FV | 39 |
| 3.5.4 Retroorbitale Blutentnahme | 39 |
| 3.5.5 Größenbestimmung der Milz während der FV-Infektion | 40 |
| 3.5.6 Virämie-Assay..... | 40 |
| 3.5.7 ELISA zur Bestimmung bindender Antikörper | 40 |
| 3.5.8 Neutralisierende Antikörper gegen FV | 41 |
| 3.5.9 IC-Assay..... | 41 |
| 3.5.10 Bestimmung der zellulären Immunantwort..... | 42 |
| 3.5.10.1 Probenvorbereitungen | 42 |
| 3.5.10.2 Stimulation mit GagL-Peptid | 42 |
| 3.5.10.3 Stimulation mit MCMV-Peptiden..... | 42 |
| 3.5.10.4 Oberflächenfärbung..... | 43 |
| 3.5.10.5 Intrazelluläre Färbung | 43 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.10.6 Tetramerfärbung | 43 |
| 3.5.10.7 Zellisolation mit der MACS-Technologie..... | 44 |
| 3.5.10.7 Zell-Transfer..... | 44 |
| 3.6 Statistische Analysen..... | 44 |
| 4 Ergebnisse | 45 |
| 4.1 Prophylaktische DNA-Immunisierung..... | 45 |
| 4.1.1 Modulation der supprimierenden Effekte von F-MuLV Env..... | 45 |
| 4.1.2 Einfluss der Zytokin-Ko-Applikation auf die Gag-L ₈₅₋₉₃ -spezifischen T-Zellantworten..... | 46 |
| 4.1.3 Einfluss der Zytokine auf die bindenden Antikörper | 48 |
| 4.1.4 Schutz vor FV-Infektion nach der Ko-Immunisierung mit Zytokinen | 48 |
| 4.2 Prophylaktische MCMV-Immunisierung..... | 52 |
| 4.2.1 Herstellung von rekombinantem MCMV | 52 |
| 4.2.2 Analyse von Immunantworten nach der Impfung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag _{CIK} | 54 |
| 4.2.3 Schutz vor FV-Infektion nach der Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag _{CIK} | 57 |
| 4.2.4 Analyse der Immunantworten nach der Immunisierung mit MCMV.env | 59 |
| 4.2.5 Schutz vor der FV-Infektion nach Immunisierung mit MCMV.env..... | 62 |
| 4.2.6 Analyse der Immunantworten nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env | 64 |
| 4.2.7 Schutz vor der FV-Infektion nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env | 70 |
| 4.2.8 Transferexperimente..... | 72 |
| 4.2.9 Analyse der Immunantworten im Langzeitversuch mit MCMV.env..... | 73 |
| 4.2.10 Schutz vor der FV-Infektion im Langzeitversuch mit MCMV.env | 77 |
| 5 Diskussion | 80 |
| 6 Zusammenfassung | 89 |
| 6.1 Summary | 91 |
| Literaturverzeichnis..... | 93 |
| Abbildungsverzeichnis | 100 |
| Tabellenverzeichnis..... | 102 |
| Abkürzungsverzeichnis | 103 |
| Danksagung | 107 |
| Erklärungen | 108 |
| Lebenslauf | 109 |

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviridae besteht aus umhüllten RNA-Viren, die in einer Wirtszelle durch den Prozess der reversen Transkription replizieren. Zu der Familie gehören die α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren, sowie die Spumaviren und Lentiviren. Die Viren sind etwa 100 nm groß und verfügen über zwei Kopien linearer Positivstrang-RNA. Während der Replikation wird diese RNA in ein doppelsträngiges DNA-Zwischenprodukt umgewandelt, welches dann in das Genom der Wirtszelle integriert wird (Provirus). Man unterscheidet weiterhin exogene und endogene Retroviren. Die exogenen Retroviren kodieren in ihrem Genom alle Gene, die für einen vollständigen Infektionszyklus benötigt werden, und die freigesetzten viralen Partikel können wieder neue Individuen infizieren. Die endogenen Retroviren bilden dagegen in der Regel keine infektiösen Partikel, sondern werden über die Keimbahnzellen von einer Generation zur nächsten weitergegeben ohne einen Infektionszyklus zu durchlaufen, da sie meist genetische Defekte aufweisen. Weiterhin können einfache und komplexe Retroviren unterschieden werden. Die Genome der einfachen Retroviren beinhalten lediglich Env (Glycoproteine), Gag (gruppenspezifische Antigene) und Pol (Enzyme), wohingegen die komplexen Retroviren zusätzlich akzessorische und regulatorische Proteine kodieren. Retroviren wurden Anfang des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal beschrieben. Im Jahr 1910 beschrieb Rous die Übertragung von zellfreien Filtraten von Geflügeltumoren in gesunde Hühner, wodurch die Tumorerkrankung übertragen wurde [108]. Heute wird das Virus Rous-Sarkoma-Virus genannt. Weitere Retroviren, wie das murine Friend Virus [43] und das Feline Leukämie-Virus, folgten [62]. Das heute bekannteste humanpathogene Retrovirus HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) löst die Immunschwäche-Krankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) aus und wurde 1983 erstmals isoliert [9].

1.1.1 Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)

Seit den 1980er Jahren hat sich HIV zu einer weltweiten Pandemie mit momentan fast 37 Millionen Infizierten entwickelt [126]. HIV gehört zu der Familie der Retroviridae und zu der Gattung der Lentiviren, wobei innerhalb dieser Gattung noch HIV-1 und HIV-2 unterschieden werden. Das Virus löst die Immunschwäche-Krankheit AIDS aus. Seit 2015 wurden 2,1 Millionen Menschen neu mit HIV infiziert, darunter 240 000 Kinder.

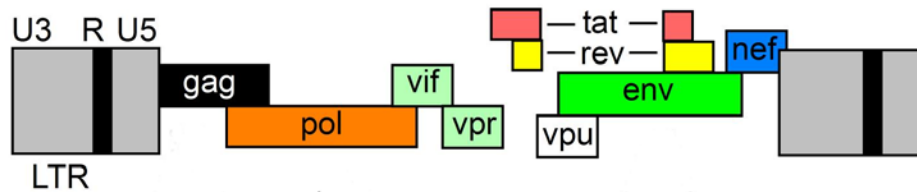


Abbildung 1: Proviraer Genomaufbau und Struktur von HIV-1. Modifiziert nach [109].

Das provirale Genom von HIV-1 hat eine Größe von 9 kb und kodiert die viralen Proteine Gag, Pol und das Oberflächenprotein Env. Zusätzlich kodiert das Genom die regulatorischen Proteine Tat und Rev, sowie die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu. Die kodierenden Bereiche werden von zwei LTR-Regionen flankiert.

Durch die steigende Zahl von Patienten, die eine antiretrovirale Therapie erhalten, geht seit 2005 die Zahl der Neuinfektionen und die Zahl der AIDS-Toten stetig zurück [126].

Die Struktur von HIV unterscheidet sich von der Struktur der einfachen Retroviren durch das Vorhandensein von akzessorischen und regulatorischen Proteinen (Abbildung 1). Die LTR-Regionen (long terminal repeat) befinden sich beim Provirus am 5'- und 3'-Ende des Genoms und stehen mit der zellulären DNA in Kontakt, kodieren aber keine viralen Proteine. Das *gag*-Gen kodiert die viralen Strukturproteine Matrix, Capsid und Nukleocapsid. Das GagPol Polyprotein, das durch eine Verschiebung des Leserahmens während der Transkription von *gag* entsteht, enthält neben den Gag-Proteinen die viralen Proteine Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Das *env* Gen kodiert die Glykoproteine gp120 und gp41. Zusätzlich kodiert das 9 kb große Genom von HIV-1 noch die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu. Tat und Rev hingegen sind regulatorische Proteine; Tat ist essentiell für die Transkription des viralen Genoms und Rev beeinflusst die Expression der strukturellen Proteine (Gag, Pol und Env) indem es den Export der für sie kodierenden mRNAs aus dem Zellkern ermöglicht [47].

Das HIV-1 Virus bindet an den CD4-Rezeptor von CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen (Abbildung 2). Für eine effiziente Bindung und den Eintritt in die Zelle bindet das Virus zusätzlich an den Ko-Rezeptor CXCR4 oder CCR5. Nach der Fusion des Virus mit der Membran der Zielzelle wird das virale Genom freigesetzt, durch die virale Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben und durch die Integrase in das Genom der Zelle integriert. Nach der Integration können alle viralen RNAs synthetisiert werden, die dann von der zellulären Maschinerie translatiert werden. Die Bildung der neuen Viruspartikel wird durch die Bindung der Gag-Proteine an die Zellmembran eingeleitet. Nach der Partikelbildung schnüren sich die neuen Viruspartikel von der Zelloberfläche ab und können einen neuen Infektionszyklus einleiten.

Zur Behandlung von HIV stehen antiretrovirale Therapien zur Verfügung, die jedoch den Verlauf der Erkrankung nur verlangsamen, aber nicht heilen können. Bei der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) werden mindestens drei verschiedene antiretrovirale Medikamente kombiniert, die meist unterschiedlichen Wirkstoffklassen angehören. Bei der Therapie werden meist zwei nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) mit einem nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase Inhibitor (NNRTI), einem Integraseinhibitor (INI) oder einem Proteaseinhibitor (PI) kombiniert. Die Therapie ist dabei im günstigsten Fall so wirksam, dass sich bei behandelten Patienten kein Virus oberhalb der Nachweisgrenze gängiger Analysemethoden mehr nachweisen lässt. Meist vertragen die Patienten die Therapie gut, dennoch können vor allem zu Beginn der Therapie Nebenwirkungen auftreten; langfristig können Resistenzen des Virus gegen die verwendeten Medikamente entstehen. Die Kosten für eine HIV-Therapie sind sehr hoch und vor allem in Entwicklungsländern werden dadurch nicht alle betroffenen Patienten ausreichend versorgt. Der einzig effektive Schutz vor einer HIV-Infektion ist daher Aufklärung und Vorbeugung einer Infektion durch die Verwendung von sterilen medizinischen Geräten, die Kontrolle von Blutprodukten und sicheren Sexualpraktiken.

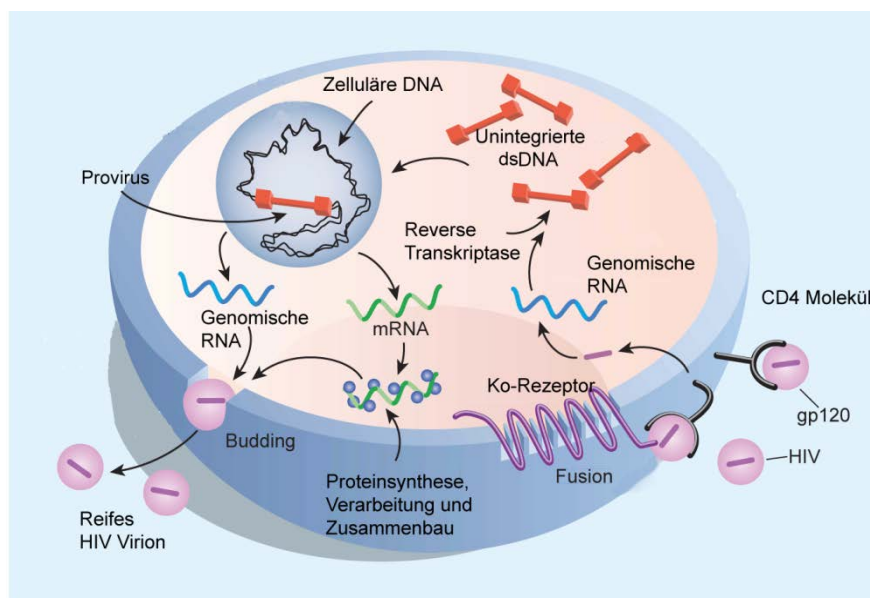


Abbildung 2: Infektionszyklus von HIV-1. Modifiziert nach [119].

HIV-1 bindet mit Hilfe von gp120 an den CD4-Rezeptor, sowie an den Ko-Rezeptor CXCR4 oder CCR5. Nach der Fusion mit der Zellmembran wird die virale RNA durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgewandelt, die dann in die zelluläre DNA integriert wird und als Provirus bezeichnet wird. Nach der Integration können alle viralen RNAs synthetisiert werden, die dann von der zellulären Maschinerie translatiert werden. Neue Viruspartikel bilden sich an der Zellmembran durch Assemblierung von Gag- und Env-Proteinen. Die neuen Viruspartikel schnüren sich von der Zellmembran ab (Budding) und reife HIV-Virionen können wieder neue Zellen infizieren.

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HIV wird in der Forschung favorisiert, da sie prophylaktisch eine HIV-Infektion verhindern könnte. Die bisherigen Erkenntnisse aus der Vakzinentwicklung zeigen, dass ein wirksamer Impfstoff komplexe Immunantworten hervorrufen muss, die sowohl zelluläre, als auch humorale Antworten umfassen. Allerdings darf dabei die Suszeptibilität der CD4⁺ Zellen, als Zielzellen der HIV-Infektion, nicht erhöht werden. Die Entwicklung eines Impfstoffes wird zusätzlich durch die hohe Mutationsrate und die damit verbundene Variabilität von HIV erschwert. Außerdem fehlt ein geeignetes Kleintiermodell für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes; zwar sind heute humanisierte Mäuse verfügbar, die ein menschliches Immunsystem tragen und mit HIV infiziert werden können, aber ihre Anzahl ist begrenzt und ihre Herstellung aufgrund der Verwendung von menschlichem embryonalen Gewebe ethisch umstritten. Eine HIV-ähnliche Infektion in Affen löst das Simiane Immundefizienz-Virus in Rhesus-Makaken und Schimpansen aus. Die Verwendung von Affen in der Forschung ist allerdings ethisch sehr umstritten und zusätzlich problematisch durch die hohe genetische Variabilität der Tiere und die hohen Anforderungen an deren Haltung. Es wäre also ein Mausmodell von Vorteil, dessen Verfügbarkeit weniger begrenzt ist und in dem genetische Homogenität herrscht. In der Grundlagenforschung wird das Friend Virus Modell favorisiert, das große immunologische Ähnlichkeit zur HIV-Infektion im Menschen aufweist und daher für die Entwicklung eines Vakzins geeignet ist.

1.1.2 Friend Virus (FV)

Das Friend Virus (FV) ist ein murines Leukämie Virus, das 1957 von Charlotte Friend identifiziert wurde [43]. FV gehört zu den γ -Retroviren und ist ein retroviraler Komplex bestehend aus dem replikationskompetenten, apathogenen Helfer-Virus F-MuLV und dem replikationsinkompetenten, pathogenen *spleen focus forming virus* (SFFV). In suszeptiblen Mäusen induziert das FV eine schnelle Erythroblasten-Proliferation, eine Splenomegalie und eine tödliche Erythroleukämie. Die Pathogenität des Viruskomplexes wird durch die Pathogenität von SFFV erreicht. Das Genom von SFFV weist Deletionen in Gag, Pol und Env auf, wodurch das Virus keine Partikel bilden kann und dadurch replikationsinkompetent ist (Abbildung 3). Allerdings entsteht durch die Deletion in *env* ein trunkiertes Env-Protein, das mit dem Erythropoietin-Rezeptor (Epo-Rezeptor) interagieren kann und durch dessen Aktivierung eine schnelle Erythroblasten-Proliferation induziert wird, wodurch sich eine Splenomegalie entwickelt. Sowohl bei dem Genom von SFFV, als auch bei dem Genom von F-MuLV handelt es sich um einfache retrovirale Genome.

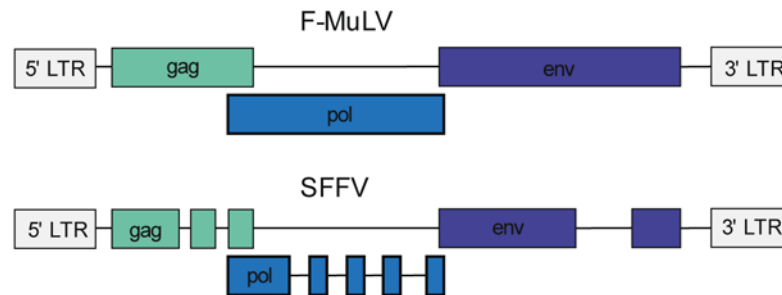


Abbildung 3: Die proviralen Genome des FV-Komplexes.

Die proviralen Genome von F-MuLV und SFFV sind einfach aufgebaut und enthalten die Gene *gag*, *pol* und *env*. Das Genom von SFFV weist mehrere Deletionen auf, wodurch das Virus replikationsinkompetent ist.

Die Suszeptibilität der Mäuse hängt von ihrem genetischen Hintergrund ab. Resistente Mausstämmen, wie C57BL/6, entwickeln keine Splenomegalie, allerdings können sie das Virus nicht vollständig eliminieren, so dass eine chronische Infektion entsteht. Die Kontrolle der Splenomegalie hängt vom MHC-Haplotyp der Mäuse ab, „*high recovery*“ Mausstämmen tragen den H-2^b-Haplotyp und entwickeln eine komplexe Immunantwort gegen die Infektion [55]. Suszeptible Stämme, wie Balb/c, tragen den H-2^d-Haplotyp und entwickeln beispielsweise verschlechterte CD4⁺ T-Zellantworten im Vergleich zu resistenten Mäusen. Die neutralisierenden Antikörperantworten werden durch den *rfl3* Locus, der u.a. Apobec3 kodiert, beeinflusst [111]. Die Entwicklung einer Splenomegalie hängt von dem *fv-2* Gen ab, das eine Stk-Kinase kodiert. Suszeptible Mäuse (Fv-2^{s/s}) kodieren eine verkürzte Form der Stk-Kinase (sf-Stk), die die Interaktion von SFFV-Env mit dem Epo-Rezeptor ermöglicht, welche dann eine erhöhte Erythroblasten-Proliferation auslöst. Resistente Mäuse (Fv-2^{r/r}) tragen eine Deletion im Stk-Promotor, so dass keine sf-Stk gebildet wird [92]. Für die prophylaktische Impfstoffentwicklung werden vorwiegend CB6F1-Mäuse mit mittlerer Suszeptibilität (H-2^{b/d}, Rfv3^{r/s}, Fv-2^{r/s}) die durch die Kreuzung von C57BL/6 (H-2^{b/b}, Rfv3^{r/r}, Fv-2^{r/r}) und Balb/c (H-2^{d/d}, Rfv3^{s/s}, Fv-2^{s/s}) entstehen, verwendet.

Während der akuten Phase der FV-Infektion, 0-4 Wochen nach der Infektion (wpi), entwickeln resistente Mäuse eine komplexe Immunantwort gegen FV, bestehend aus T-Helferzellen (CD4⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) und neutralisierenden Antikörpern. Depletionsexperimente konnten zeigen, dass CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen sehr wichtig für die Immunkontrolle von FV sind [52, 54, 91, 99]. CD4⁺ T-Zellen erkennen neun H-2^b-restringierte FV-Epitope aus Gag, Pol und Env [81]. CD4⁺ T-Zellen unterstützen B-Zellen bei der Bildung von Antikörpern und unterstützen die Expansion von

Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen [15, 115]; vermitteln aber auch selber antivirale Effekte, z.B. durch die Ausschüttung von IFN γ [60, 99]. Unterstützend bei der Entwicklung effektiver Antikörperantworten gegen FV wirken sogenannte follikuläre T-Helferzellen (Tfh), die während der Immunantwort bis zu 40 % der Virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ausmachen [100]. CD4⁺ T-Zellen haben aber auch regulatorische Funktionen während der späten akuten und der chronischen FV-Infektion. Die sogenannten regulatorischen T-Zellen (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs) expandieren etwa 2 wpi.

Während der ersten zwei Wochen der akuten FV-Infektion werden CD8⁺ T-Zellen unabhängig von der Unterstützung durch CD4⁺ T-Zellen gebildet [105]. In resistenten C57BL/6-Mäusen finden sich die meisten aktivierten CD8⁺ T-Zellen an Tag 12 nach der Belastungsinfektion mit FV (dpi) und GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellen an Tag 14 dpi. Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen produzieren Effektor-Moleküle ab Tag 8 pi [131]. Diese Moleküle lassen sich allerdings in der chronischen Infektion (8 wpi) nicht mehr nachweisen [132]. Die Zahl der aktivierten CD8⁺ T-Zellen nimmt über die Zeit durch die Apoptose dieser Zellen stark ab und diese Abnahme korreliert mit der Zunahme regulatorischer T-Zellen. Die Suppression findet durch direkten Zell-Zell-Kontakt statt und ist unabhängig von Antigen-präsentierenden Zellen [106]. Tregs beeinflussen aber nicht nur CD8⁺ T-Zellen, sondern supprimieren 2 wpi auch die antiviralen Funktionen FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen [91].

Neben der zellulären Immunantwort ist auch die humorale Immunantwort wichtig in der FV-Infektion. Die Verwendung von B-Zell-defizienten Mäusen konnte die unentbehrliche Rolle von B-Zellen und neutralisierenden Antikörpern bei der Erholung von der FV-induzierten Splenomegalie zeigen [25, 52, 53, 80]. Die Produktion neutralisierender Antikörper gegen FV ist abhängig vom Rfv-3 Locus; Rfv-3^{s/s}-Mäuse entwickeln schwächere Antikörperantworten. Neutralisierende Antikörper lassen sich etwa ab 8 dpi nachweisen. Der passive Transfer neutralisierender Antikörper kann susceptible Mäuse nur gegen geringe Dosen FV schützen, bei hohen Dosen sind zusätzlich zelluläre Immunantworten nötig [53].

1.2 Herpes Viren

Die Herpesviren sind eine große Gruppe von DNA-Viren, die 150-200 nm groß sind und über eine Hüllmembran verfügen. Die Vertreter der Herpesviridae lassen sich drei Unterfamilien zuordnen, den α -, β - und γ -Herpesviren, die sich aufgrund ihrer Pathogenität und ihrer Vermehrungseigenschaften unterscheiden. Die bekanntesten Vertreter der α -Herpesviren sind die Herpes-Simplex (HSV) und die Varicella-Zoster-Viren, die entweder einen

bläschenartigen Hautausschlag oder Windpocken hervorrufen. Das Cytomegalievirus, als Vertreter der β -Herpesviren, ist stark speziesspezifisch und löst eine Vergrößerung der infizierten Zellen aus, wie z.B. Epithelzellen. Die γ -Herpesviren infizieren vorwiegend B- oder T-Lymphozyten; der bekannteste Vertreter ist das Epstein-Barr-Virus (EBV). Die Durchseuchung mit Herpesviren in der Bevölkerung ist sehr hoch; nach der ersten Infektion verbleiben die Viren lebenslang latent im Körper. Die Infektionen sind lediglich für immunsupprimierte oder immun-immaturen Menschen, wie Tumorerkrankte, Ungeborene oder HIV-Infizierte, gefährlich.

1.2.1 Cytomegalievirus (CMV)

Das Cytomegalievirus (CMV) ist ein β -Herpesvirus mit einem doppelsträngigen, linearen DNA-Genom. Cytomegalie, die durch CMV induzierte Erkrankung, ist durch nukleäre Einschlüsse und Riesenzellbildung gekennzeichnet [124].

Cytomegalieviren sind stark speziesspezifisch und die Virionen bestehen aus mehr als 30 Strukturproteinen (Abbildung.4). Im Inneren des Virions befindet sich das ikosaedrische Kapsid, das die doppelsträngige lineare DNA umschließt. Das Kapsid wird von einem inneren und äußeren Tegument umschlossen und diese Strukturen umgibt zusätzlich eine Hüllmembran.

Das Genom des murinen Cytomegalievirus (MCMV) hat eine Größe von ca. 230 kb und verfügt über mehr als 170 offene Leseraster (ORFs) [102]. Die hohe Wirtsspezifität kann durch die Spezialisierung der kodierten Proteine erklärt werden, da beispielsweise nur 78 der 170 ORFs Homologien mit humanem CMV (HCMV) aufweisen. Die Expression der viralen Gene kann in drei Phasen unterteilt werden: 1) die sehr frühe Phase (IE), 2) die frühe Phase (E) und 3) die späte Phase (L). Die IE-Genexpression beginnt sofort nach dem Eintritt des Virus in die Zelle durch zelluläre Transkriptionsfaktoren. Die frühe Phase wird durch die Genprodukte der sehr frühen Phase eingeleitet. In der späten Phase werden vor allem Strukturproteine, die für die Bildung neuer Viruspartikel benötigt werden, gebildet.

Der Replikationszyklus von CMV beginnt mit der Bindung der viralen Glykoproteine auf der Oberfläche des Virions an Rezeptoren auf der Membran der Zielzelle und löst so die Fusion oder Endozytose des Virions in die Zelle aus. Tegumentproteine interagieren mit den Mikrotubuli der Wirtszelle und unterstützen den Transport des viralen Capsids zum Nukleus [59]. Im Nukleus findet die Transkription, Genom-Replikation und die Einkapselung des viralen Genoms in Capside statt [44].

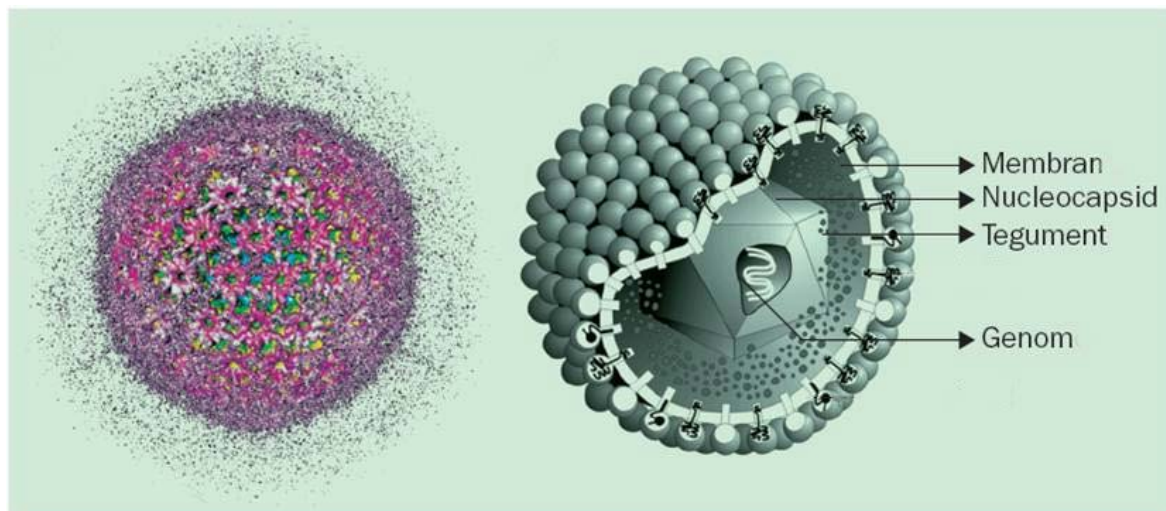


Abbildung 4: Struktur von CMV. Modifiziert nach [21]

CMV ist von einer Hüllmembran umgeben, an die das äußere und innere Tegument anschließt. Im Inneren des Partikels befindet sich das Nucleocapsid, welches die lineare doppelsträngige DNA umhüllt. Die linke Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von HCMV und die rechte Abbildung eine schematische Darstellung.

Gleichzeitig regulieren andere virale Proteine die zellulären Signalwege und den zellulären Metabolismus, um die Virusreplikation zu unterstützen und der Immunabwehr zu entgehen [129]. Die im Kern gebildeten Nucleocapside gelangen durch die Abschnürung von der inneren Kernmembran in den perinuklearen Spalt zwischen innerer und äußerer Kernmembran. Die eingehüllten Nucleocapside verschmelzen anschließend mit der äußeren Kernmembran und so werden nicht-umhüllte Nucleocapside in das Zytoplasma freigesetzt. Die endgültige Reifung der Viruspartikel findet im Assemblierungskomplex statt, der während der späten Phase der Infektion gebildet wird. Der Assemblierungskomplex enthält sowohl zelluläre Komponenten, sowie viele virale Struktur- und Tegumentproteine, die für die Bildung reifer Virionen wichtig sind. Das reife Virion erhält seine Hülle durch die Akkumulierung viraler Glykoproteine und die Knospung in zytoplasmatische, vom Golgi-Apparat abstammende Kompartimente [58]. Umhüllte virale Partikel werden an der Membranoberfläche der Zelle freigesetzt.

Eine HCMV-Infektion wird in immunkompetenten Individuen nicht behandelt, da das Immunsystem die Infektion selbst kontrollieren kann. In immunsupprimierten Patienten, z.B. nach einer Transplantation oder HIV-Infektion, erfolgt die Behandlung durch antivirale Medikamente. Die möglichen Medikamente umfassen Nukleinbasen-Analoga (Ganciclovir), Pyrophosphat-Inhibitoren (Foscarnet) und virale DNA-Polymerase-Inhibitoren (Cidofovir) [117]. Ein Impfstoff gegen HCMV existiert nicht, wäre aber vor allem zum Schutz von Föten und Neugeborenen wichtig, da HCMV auch transplacental oder während der Geburt

übertragen werden kann, was zu schweren Wachstumsverzögerungen und Organschädigungen führen kann [68].

1.3 Impfstoffe

Der erste Impfstoff entstand wahrscheinlich schon 200 v. Chr. in China, wo durch Variolation gegen die Pocken geimpft wurde. Während der Pockenepidemien in Europa erfolgte die prophylaktische Impfung gesunder Individuen mit Kuhpocken-enthaltenden Extrakten [79]. Impfstoffe haben zum massiven Rückgang von Erkrankungen wie Diphtherie, Polio oder Masern geführt. Allerdings existieren weiterhin Erkrankungen für die bisher kein Impfstoff entwickelt werden konnte, wie Hepatitis-C oder AIDS.

Es gibt verschiedene Formen von Impfstoffen die eine schützende Immunantwort induzieren können. Lebendimpfstoffe sind replikationsfähig und induzieren meist sowohl neutralisierende Antikörper, als auch zelluläre Immunantworten. Zu diesen Impfstoffen zählen attenuierte Viren oder Bakterien. Die abgeschwächten Viren tragen Mutationen im Wildtypgenom, die die Pathogenität des Virus herabsetzen, aber das Virus kann weiterhin komplexe Immunantworten induzieren [76]. Bei manchen Viren, wie dem Retrovirus HIV, ist allerdings das Risiko von Rückmutationen für die Nutzung von attenuierten Viren zu hoch [125].

Zu den Totimpfstoffen, die sich im Organismus nicht mehr vermehren können, gehören abgetötete Viren oder Bakterien, sowie Protein- und Peptid-Impfstoffe. Protein- und Peptidimpfstoffe induzieren meist nur neutralisierende Antikörper und keine zellulären Immunantworten. Die Impfstoffe haben den Nachteil, dass sie meist nur schwach immunogen sind und daher sehr häufig geimpft werden muss, um eine Immunantwort zu induzieren. Allerdings bieten diese Impfstoffe eine sehr hohe Sicherheit, da sie nur Teile des Virus enthalten, wie z.B. bei dem Impfstoff gegen Hepatitis B [12]. Adjuvantien können ebenfalls die Immunogenität solcher Protein- oder Peptidimpfstoffe, sowie anderer Impfstoffe, steigern. Das Freund'sche Adjuvans zählt zu den bekanntesten Hilfsstoffen und ist eine Emulsion aus Wasser und Mineralöl, sowie abgetöteten Mycobakterien und Aluminiumhydroxid. Durch Adjuvantien soll erreicht werden, dass das Antigen verzögert freigesetzt wird, was zu einer erhöhten Stimulation des Immunsystems führt. Allerdings lösen Adjuvantien teilweise starke Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden aus, was gegen ihre Verwendung spricht. Neben den klassischen Adjuvantien werden auch genetische Adjuvantien, wie Zytokine oder Toll-like-Rezeptor-Liganden, zur Steigerung der Immunantwort verwendet [66, 94, 98, 120]. Die Immunogenität eines Proteins lässt sich zusätzlich noch durch die Fusion mit einem

weitem, hoch-immunogenen Molekül steigern. Dazu gehört beispielsweise das Enzym Thioredoxin, das Monozyten und T-Lymphozyten anlocken kann [22] oder der Ligand CD154 (CD40L), der an CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen bindet und diese aktiviert [5].

Neben den Tod- und Lebendimpfstoffen gibt es noch Gen-basierte Impfstoffe, wie virale Vektoren und DNA-Impfstoffe. Virale Vektoren tragen meist ein Transgen von Pathogenen zur transienten Expression. Das Transgen ersetzt dabei meist DNA-Abschnitte des viralen Genoms, die für ihre Replikation benötigt werden, so dass der virale Vektor nach der Klonierung replikationsinkompetent ist. Ein Beispiel für virale Vektoren sind adenovirale Vektoren, die eine hohe Transgenkapazität haben, die nur durch CMV-basierte Vektoren noch übertroffen wird. Adenovirale Vektoren tragen Deletionen in Wildtypgenen, die die Replikation des Virus verhindern.

DNA-Impfstoffe sind bakterielle Plasmide, in die ein Transgen eingebracht wird, das meist unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. Die Immunogenität von DNA-Impfstoffen kann durch die Wahl der Applikationsmethode stark verbessert werden. Die Verpackung in Nanopartikel erhöht die Immunogenität der applizierten DNA [71]. Auch Elektroporation kann die Aufnahme von DNA-Impfstoffen verbessern. Die Wahl des richtigen Vakzins sollte von der Schutzkorrelation und der Sicherheit des Impfstoffes abhängen.

1.3.1 HIV-Impfstoffe

Die Entwicklung von prophylaktischen HIV-Impfstoffen ist mit vielen Hürden verbunden. Ein lebend attenuierter HIV-Impfstoff kann aufgrund des Risikos von Rückmutationen nicht verwendet werden, da das Risiko einer erneuten Virulenz des Virus besteht. Rekombinante Protein-Impfstoffe induzieren meist keine komplexen Immunantworten, die für den Schutz gegen eine HIV-Infektion favorisiert werden, sondern nur Antikörperantworten. Potentielle HIV-Immunogene finden sich in den Hüllproteinen von HIV. Allerdings sind viele konservierte Regionen von Env für neutralisierende Antikörper kaum zugänglich. HIV Env ist ein stark glykosyliertes Homotrimer bestehend aus drei nicht kovalent assoziierten Heterodimeren von gp120 und gp41. Die konservierten Bindungsstellen in HIV Env sind bis zur Bindung an den CD4-Rezeptor und den Ko-Rezeptor für Antikörper nicht zugänglich. Versuche mit neutralisierenden Antikörpern, die aus HIV-Patienten isoliert wurden, zeigen, dass diese Antikörper meist nur das Ursprungsvirus neutralisieren können, aber nicht andere mutierte HI-Viren, die durch den Druck des Immunsystems entstanden sind [19].

Ein weiterer Ansatz für einen HIV-Impfstoff stellt die Verwendung von viralen Vektoren dar [39]. Adenovirale Vektoren des Serotyps 5 (Ad5), die HIV-1 Gag, Pol und Nef exprimierten, induzierten in der Step-Studie zwar gute CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten, reduzierten aber nicht die Viruslast in infizierten Patienten. Eine vorher existierende Immunität gegen Ad5 erhöhte sogar die HIV-1 Viruslast in den betroffenen Patienten, da Ad5-spezifische CD4⁺ T-Zellen suszeptibler für HIV waren [77]. Nach der vorsichtigen Analyse der Step-Studie wurde allerdings noch eine DNA Prime/rAd5 Boost Impfstudie durchgeführt, deren Teilnehmer alle eine geringe Ad5-Prä-Immunität aufwiesen. Die verwendeten DNA-Plasmide exprimierten 6 HIV Proteine von verschiedenen HIV-Subtypen und der adenovirale Vektor exprimierte ein GagPol Fusionsprotein und Env von verschiedenen Subtypen, um einen Schutz gegen mehrere HIV-Stämme zu induzieren. Die Prime-Boost Vakzinierung induzierte zwar gute zelluläre und humorale Immunantworten, wurde aber auch wegen einem Anstieg der HIV-Infektionen in Ad5-präimmunisierten Teilnehmern, wie in der Step-Studie, abgebrochen. Um die Problematik mit der Prä-Immunität gegen Ad5 zu umgehen werden heute adenovirale Vektoren basierend auf raren Serotypen, wie 26 oder 35, getestet [8].

Eine im Vergleich zu der Step-Studie recht erfolgreiche Impfstudie gegen HIV ist die in Thailand durchgeführte klinische Phase III-Studie RV-144. Der verwendete Vektor ALVAC ist ein auf Kanarienvogel-basierender Vektor, der nicht in humanen Zellen repliziert. Vier Prime-Injektionen mit ALVAC-HIV gefolgt von zwei Boost-Injektionen mit einem rekombinanten gp120 Impfstoff (AIDSVAX B/E) schützte über 30 % der geimpften Teilnehmer langfristig. In dieser Studie zeigten die geschützten Teilnehmer hohe Konzentrationen von IgG Antikörpern, die spezifisch für die V1V2-Schleife von gp120 waren [57], wodurch neutralisierende Antikörper in den Fokus der Forschung gerückt sind.

Eine sehr vielversprechende Studie in Rhesus Makaken mit einem Rhesus-CMV-basierten Vektor, der SIV Proteine exprimiert, konnte zeigen, dass 56 % der geimpften Affen eine SIV Infektion kontrollieren konnten. Im Vergleich zu anderen Vektoren induziert dieser persistierende Vektor starke Effektor-Gedächtnis-T-Zellantworten (T_{EM}), die nach der Belastungsinfektion mit SIV die Mehrheit der Makaken schützte [48, 49]. Die Impfung zeigte außerdem keine Probleme bei einer existierenden Prä-Immunität gegen den Impfvektor. Die induzierten T-Zellantworten waren allerdings stark abhängig vom verwendeten RhCMV-Stamm. Der verwendete RhCMV-Stamm 68-1, der Deletionen in *UL128-131* trägt und damit an Fibroblasten adaptiert ist [20, 75], induzierte CD8⁺ T-Zellantworten gegen unkonventionelle CD8⁺ T-Zellepitope [50]. Der reparierte Stamm oder konventionelle

RhCMV Vektoren induzierten diese Antworten nicht [8]. Es zeigte sich, dass einige dieser CD8⁺ T-Zellantworten gegen Peptide auf MHC II-Molekülen, anstatt wie normalerweise gegen Peptide auf MHC I-Molekülen, gerichtet waren. In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass zwölf Peptide MHC-E-restringierte CD8⁺ T-Zellantworten hervorriefen und dadurch eine Immunevasion des Virus verhindert wurde [51, 78]. Zusätzlich konnten noch zwei „Super-Epitope“ identifiziert werden, die von allen vakzinierten Makaken erkannt wurden [51]. Studien in Menschen sollen folgen, allerdings bleibt abzuwarten, ob eine ähnliche Immunantwort mit HCMV-basierten Vektoren erzielt werden kann. Voruntersuchungen mit dem ebenfalls an Fibroblasten adaptierten Towne/Toledo HCMV-Stamm induzierten nur konventionelle Immunantworten bezogen auf die präsentierten Epitope und die MHC-Restriktion [90].

1.3.2 FV-Impfstoffe

Für die Verbesserungen von Impfstoffen gegen HIV bietet sich das Friend-Virus Modell an, da es sich bei FV ebenfalls um ein Retrovirus handelt und man grundlegende Informationen über Retrovirus-spezifische Immunantworten sammeln kann. Das bisher einzige Vakzin, das vollständig gegen eine FV-Infektion schützt, ist lebend-attenuiertes F-MuLV-N, da es komplexe Immunantworten auslöst [34]. Transferexperimente konnten zeigen, dass für einen vollständigen Schutz CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie CD19⁺ B Zellen benötigt werden [36]. Lebend-attenuierte Viren eignen sich allerdings im Fall von HIV aufgrund der Sicherheitsrisiken nicht für eine Impfung, daher wurden im Friend-Virus Modell virale Vektoren, DNA- und Peptidimpfstoffe etabliert. Peptidimpfstoffe enthalten meist ein Bindungsepitop für antivirale oder neutralisierende Antikörper. Eine prophylaktische DNA-basierte Impfung gegen F-MuLV konnte mehr als die Hälfte der geimpften Mäuse gegen eine Infektion schützen [37]. Im FV-Modell wurden susceptible Mäuse prophylaktisch mit einem Env₁₂₃₋₁₄₁-Epitop-enthaltenden Peptid geimpft; die Impfung induzierte gute neutralisierende Antikörperantworten und die vakzinierten Mäuse erholten sich von der Splenomegalie [84]. Virale Vektoren werden in Immunisierungen favorisiert, da sie im Gegensatz zu Peptidimpfstoffen komplexe Immunantworten induzieren können. Adenovirale Vektoren werden häufig als Impfvektoren eingesetzt, da sie eine hohe Transgenkapazität aufweisen und verschiedene Zelltypen transduzieren können [127]. Immunisierungen mit zwei verschiedenen adenoviralen Vektoren (Ad5 und einem Fiber-chimären Ad5F35), die F-MuLV Env und Gag exprimieren, konnten nach einer heterologen Prime-Boost Immunisierung die Viruslasten gegenüber einer homologen Immunisierung in

suszeptiblen CB6F1-Mäusen stark reduzieren [10]. Der Schutz wurde wahrscheinlich durch neutralisierende Antikörper vermittelt. In einer weiteren Arbeit wurde der konventionelle Env-kodierende Vektor weiter optimiert, dabei wurde das virale Oberflächenprotein gp70 von F-MuLV mit dem adenoviralen Capsidprotein IX fusioniert, wodurch das Immunogen auf der Oberfläche des Partikels dem Immunsystem präsentiert wird. Die Immunisierung mit diesem Vektor führte zur Induktion von CD4⁺ T-Zellantworten und bindenden Antikörpern, wodurch die Viruslasten niedrig blieben [11]. Die Verwendung von Interleukinen, Chemokinen oder Interferonen als genetischen Adjuvantien in Kombination mit verschiedenen Vektoren konnte häufig die induzierten humoralen und zellulären Immunantworten weiter verbessern [67, 72, 95]. Eine komplexe Immunantwort ist nötig, um Mäuse effektiv gegen eine FV-Infektion zu schützen. Das Leader-Gag Protein von F-MuLV enthält das einzig bekannte CD8⁺ T-Zellepitop GagL₈₅₋₉₃ [23] und während der natürlichen Infektion sind 15 % der induzierten CD8⁺ T-Zellen spezifisch für dieses Epitop [131]. Im adenoviralen Hintergrund war das Leader-Gag Protein nicht in der Lage GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten zu induzieren, da es wahrscheinlich bei der Peptid-Kompetition gegen adenovirale Proteine zu schwach war. Durch eine Modifikation wurde der proteasomale Abbau von Leader-Gag verbessert; bei Leader-Gag_{C1K} wurde das Tyrosin an der das Epitop C-terminal flankierenden Position C + 1 durch ein Lysin ersetzt. Im adenoviralen Hintergrund induzierte Leader-Gag_{C1K} potente GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten und induzierte einen guten Schutz gegen die FV-Infektion. Um die immunstimulatorischen Eigenschaften von Leader-Gag zu steigern, wurde ein adenoviraler Vektor konstruiert, der ein Thioredoxin (Txn)-GagL Fusionsprotein exprimiert und der nach der Immunisierung sehr hohe GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten induzierte, aber den Schutz gegenüber Ad.Gag_{C1K} nicht weiter verbessern konnte [13, 45]. In weiteren Versuchen wurden die adenoviralen Vektoren Ad.TxnGagL und Ad.Gag_{C1K} jeweils mit Ad.pIXgp70 kombiniert, um eine komplexe Immunantwort bestehend aus CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und neutralisierenden Antikörpern zu induzieren. Überraschenderweise induzierte die Kombination keine komplexe Immunantwort, sondern die Kombination hob die Induktion GagL₈₅₋₉₃-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Leader-Gag auf. Dieser Effekt konnte durch eine Prime-Boost Immunisierung, bei der mit Ad.TxnGagL zuerst geimpft wurde und erst einige Zeit später mit Ad.pIXgp70, aufgehoben werden. Der Mechanismus hinter der Immunsuppression von Ad.pIXgp70 ist bisher ungeklärt; zwar gibt es eine immunsuppressive Domäne (Isu) in Env [30], diese ist aber im transmembranen Teil von Env lokalisiert und nicht im Oberflächenprotein gp70. Der supprimierende Effekt von Env soll durch

Veränderungen im Zytokinprofil der induzierten $CD4^+$ T-Zellen vermittelt werden, die vermehrt supprimierende Interleukine wie IL6 und IL10 ausschütten [31]. Ad.Env induzierte ebenfalls die Ausschüttung von IL10, wodurch der supprimierende Effekt auf ein gleichzeitig injiziertes Immunogen erklärt werden könnte [67]. Die bisher verfolgten Ansätze induzieren meist entweder $CD4^+$ T-Zellen und neutralisierende Antikörper oder $CD8^+$ T-Zellen, aber keine komplexen Immunantworten, da die Kombination von F-MuLV Env und Leader-Gag durch teilweise unbekannte, immunsuppressive Mechanismen die Induktion von $CD8^+$ T-Zellen unterdrückt.

1.4 Zielsetzung

Anti-retrovirale Impfstoffe sollten in der Lage sein komplexe Immunantworten bestehend aus spezifischen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen, sowie neutralisierenden Antikörpern zu induzieren, um einen umfassenden Schutz gegen die Infektion zu gewährleisten. Den bisherigen „Goldstandard“ im Hinblick auf komplexe Immunantworten und einen sehr guten Schutz vor der FV-Infektion stellt die Impfung mit lebend attenuiertem F-MuLV-N dar. Da lebend attenuierte Impfstoffe gewisse Risiken bergen, werden auch im FV-Modell andere Techniken wie virale Vektoren oder DNA-Impfstoffe favorisiert, die aber bisher keinen vollständigen Schutz, vergleichbar mit F-MuLV-N, induzieren konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Vektor-basierende Impfstrategien für die prophylaktische Immunisierung im Friend-Retrovirus-Modell entwickelt werden, die eine komplexe Immunantwort induzieren und die immunsuppressiven Eigenschaften von Env auf die Gag_{L85-93} -spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten modulieren sollten, die sich zuvor im adenoviralen Hintergrund gezeigt hatten. Um eine Peptid-Kompetition wie bei GagL im adenoviralen Hintergrund zu vermeiden sollten DNA-Impfstoffe verwendet werden, die F-MuLV Leader-Gag oder Env kodieren, und mit genetischen Adjuvantien kombiniert werden. Genetische Adjuvantien, wie Zytokine, konnten in der Vergangenheit bereits erfolgreich zur Verstärkung von Immunantworten gegen eine FV-Infektion genutzt werden. Die Zytokine IL1 β , IL12, IL15, IL18, IL21, IL28A und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) sind für ihre direkten oder indirekten Effekte auf das Priming und Überleben von $CD8^+$ T-Zellen bekannt, daher wurden sie hier als genetische Adjuvantien für die Impfung gewählt. Es sollte analysiert werden, ob diese Zytokine bei der Ko-Applikation mit F-MuLV Env- oder Leader-Gag-kodierenden Vektoren die immunsupprimierenden Eigenschaften von Env aufheben können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zusätzlich neue virale Vektoren auf der Basis von MCMV, die F-MuLV Proteine exprimieren, konstruiert und getestet werden. Virale Vektoren finden auch in der HIV-Forschung Verwendung; induzierten bisher aber keinen hundertprozentigen Schutz gegen eine Infektion. Ein neuer Ansatz basiert auf RhCMV, welches SIV Proteine exprimiert und den bisher höchsten Schutz verglichen mit anderen Studien in Makaken induzieren konnte. Im murinen FV-Modell sollte ein replikationskompetenter MCMV-basierter Impfstoff, der entweder F-MuLV Env, Leader-Gag oder Leader-Gag_{CIK} exprimiert, auf die Induktion von Immunantworten und den induzierten Schutz gegen eine FV-Infektion getestet werden. F-MuLV Env sollte vor allem CD4⁺ T-Zellantworten und neutralisierende Antikörper und Leader-Gag und Leader-Gag_{CIK} CD8⁺ T-Zellantworten induzieren. Im adenoviralen Hintergrund induzierte Leader-Gag erst nach einer Aminosäuresubstitution, wodurch Leader-Gag_{CIK} entstand, potente Gag_{L85-93}-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten, deshalb sollte diese Modifikation auch hier getestet werden. Dazu sollten Env, Leader-Gag und Leader-Gag_{CIK} in ein $\Delta m157$ -MCMV-Bacmid eingebracht werden, wo durch die Deletion in *m157* die Erkennung des Virus durch Natürliche Killerzellen verhindert wird. Durch die Deletion sollte sichergestellt werden, dass das Virus in der Maus repliziert und so auch die eingebauten Immunogene stärker exprimiert und dem Immunsystem präsentiert werden. Zusätzlich sollte auch im MCMV-Hintergrund analysiert werden, ob die supprimierenden Effekte von F-MuLV Env sich auch hier zeigen.

2 Material

2.1 Chemikalien

| | | |
|---|------------------|------------------------------------|
| Acrylamid | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Amersham ECL WB Detektionslösung | GE Healthcare | Little Chalfont, UK |
| 3-Amino 4-Ethylcarbazol (AEC) | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Agarose | Biozym | Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Ammoniumchlorid | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Ammoniumpersulfat (APS) | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| autoMACS Lauf- und Waschpuffer | Miltenyi Biotec | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Bacto-Peptide | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | PAA | Pasching, Österreich |
| Brefeldin A (BFA) | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Calciumchlorid | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| CDP-Star | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Dextrose-H ₂ O | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| DIG-Easy-Hyb | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Dimethylformamid (DMFA) | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Di-Natrium- hydrogenphosphat | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline (DPBS) | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| 100 % Essigsäure | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol p.a. | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol, vergällt 96 % | Alfred Quadflieg | Gelsenkirchen, Deutschland |
| Ethidiumbromid | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Ethylenglycol- bis(aminoethylether)- | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |

| | | |
|---|---------------|------------------------|
| N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | | |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Biochrom | Berlin, Deutschland |
| Glucose | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Glycerin | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Glycerol | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Glycin | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Hefe Extrakt | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Hexadimethrinbromid (Polybren) | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Isofluran | Abbott | Wiesbaden, Deutschland |
| Kaliumchlorid | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumhydrogencarbonat | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| LB-Agar | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Lipofectamine® 2 000 | Thermo Fisher | Darmstadt, Deutschland |
| Magermilchpulver | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Meerschweinchen Komplementserum | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Maleinsäure | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol | VWR Chemicals | Darmstadt, Deutschland |
| Methylzellulose | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Natriumacetat | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumazid | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumcarbonat | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumdeoxycholat | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck | München, Deutschland |
| Natriumfluorid | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumhydrogencarbonat | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Natronlauge | Roth | Karlsruhe, Deutschland |

| | | |
|--------------------------|---------------|------------------------|
| Nonidet P40 | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| Polyacrylamid | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Saccharose | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| SuperFect-Reagenz | Qiagen | Hilden, Deutschland |
| 100x TE | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| TEMED | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Trinatriumcitratdihydrat | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| TriZol | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| Tween 20 | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid 30 % | Roth | Karlsruhe, Deutschland |

2.2 Geräte

| | | |
|--|----------------|--------------------------------|
| AutoMACS® Pro Separator | Miltenyi | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| BioPhotometer plus | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Brutschränke und Inkubatoren: CO ₂ Inkubator Modell 371 HERACELL 240i CO ₂ Incubator Heraeus Inkubator Typ B6 Inkubationsschüttler MaxQ 6000 | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| <i>Douncer</i> | Wheaton | Millville, USA |
| Durchflusszytometer FACS Canto II | BD Biosciences | Heidelberg, Deutschland |
| Durchflusszytometer FACS LSR II | BD Biosciences | Heidelberg, Deutschland |
| Eismaschine MF 30 | Scotsman | Mailand, Italien |
| Elektrophoresesystem PerfectBlue Mini L | VWR Peqlab | Erlangen, Deutschland |
| Elektroporator Agile Pulse | BTX | Holliston, MA, USA |
| Elektroporatornadeln Needle Array 4 x 4 x 5 mm | BTX | Holliston, MA, USA |
| Gefrierschrank -20 °C | Liebherr | Biberach, Deutschland |
| Gefrierschrank -80 °C | Sanyo | München, Deutschland |
| Geldokumentationskammer Gene Genius | Syngene | Cambridge, Großbritannien |
| Hybridisierungssofen | Biometra | Göttingen, Deutschland |
| Kleintiernarkosegerät | UNO | Zevenaar, Niederlande |
| Kühlschrank UK1720 | Liebherr | Biberach, Deutschland |

| | | |
|--|---------------------------|-----------------------------------|
| MACS-Zellsortierer | Miltenyi | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Magnetrührer RH basic | IKA | Staufen, Deutschland |
| Mikroplattenlesegerät Asys Expert Plus | Biochrom | Berlin, Deutschland |
| Nanodrop | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| Pipetten | Starlab | Hamburg, Deutschland |
| Pipettierhilfe | Hirschmann Laborgeräte | Eberstadt, Deutschland |
| Präzisionswaage EMB 1000-2 | Kern | Balingen-Frommern, Deutschland |
| Spannungsquelle Standard Power Pack P25 | Biometra | Göttingen, Deutschland |
| ThermalCycler C1000 | BIO-RAD | München, Deutschland |
| Thermoschüttler MHR11 | HLC BioTech | Bovenden, Deutschland |
| Ultrazentrifuge Optima L-80 XP mit Rotor NVT 90 oder SW 32 | Beckman Coulter | Krefeld, Deutschland |
| Vortex | IKA | Staufen, Deutschland |
| Waage 440-47 N | Kern | Balingen-Frommern, Deutschland |
| Wasserbad | Julabo | Seelbach, Deutschland |
| Zentrifuge 5424 mit Rotor FA-45-24-11 | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge 5430 R mit Rotor FA-45-30-11 oder A-2-MTP | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge 4-16 K mit Rotor 11650 mit Einsatz 13421 oder 13450 | Sigma | Osterode am Harz, Deutschland |
| Zentrifuge Avanti J-26 XP mit Rotor O7U-762 | Beckman Coulter | Krefeld, Deutschland |

2.3 Enzyme

| | | |
|---|---------------------------|--------------------------------|
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2000 U/ml) | New England Biolabs (NEB) | Frankfurt a.M., Deutschland |
| Restriktionsenzyme | New England Biolabs | Frankfurt a.M., Deutschland |
| RNase | Sigma-Aldrich | München, Deutschland |
| T4 DNA Ligase | New England Biolabs | Frankfurt a.M., Deutschland |

2.4 Verbrauchsmaterialien

| | | |
|--------------------------|-----------------|----------------------------|
| 6-, 24-, 96-Loch-Platten | Greiner Bio-One | Frickenhausen, Deutschland |
| 96-Loch MaxiSorp Platten | Nunc | Roskilde, Dänemark |

| | | |
|---|-------------------------|-----------------------------------|
| Bakterienröhrchen 13 ml | Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |
| Cellstrainer MACS SmartStrainers | Miltenyi | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Einwegspritzen (0,3 ml, 0,5 ml) | VWR | Darmstadt, Deutschland |
| Filterpapier | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| Filterspitzen | Starlab | Hamburg, Deutschland |
| Fotofilm Amersham Hyperfilm ECL | GE Healthcare | Solingen, Deutschland |
| Gene Pulser® Cuvette 0,2 cm | BIO-RAD | München, Deutschland |
| Kanülen BD Microlance™ 3 | BD biosciences | Heidelberg, Deutschland |
| Kapillaren minicaps, NA- HEP. | Hirschmann® Laborgeräte | Eberstadt, Deutschland |
| Nitrozellulosemembran Protran | Whatman | Maidstone, Großbritannien |
| Petrischalen | Greiner Bio-One | Frickenhausen, Deutschland |
| Petrischalenspatel | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Greiner Bio-One | Frickenhausen, Deutschland |
| Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl) | Greiner Bio-One | Frickenhausen, Deutschland |
| Pipettenspitzen 5ml | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen MultiFlexRound Tips | Peqlab | Erlangen, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml) | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Röhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One | Frickenhausen, Deutschland |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Beckman Coulter | Krefeld, Deutschland |

2.5 Standardlösungen und Puffer

| | |
|---------------------|---|
| ACK-Lysepuffer | 8,28 g/l Ammoniumchlorid 1 g/l Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA |
| AEC-Gebrauchslösung | 13 ml H ₂ O 0,325 ml 3 M Natriumacetat 0,624 ml AEC-Stammlösung 7 µl Wasserstoffperoxid 30% |
| AEC-Stammlösung | 4 mg/ml AEC in DMFA |

| | |
|-----------------------|---|
| 10x AP-Puffer | 1 M Tris/HCl pH 7,5 1 M NaCl |
| Blocklösung | 0,05 % (w/v) Magermilch in PBS + 0,1 % Tween-20 |
| Boehringer Lysepuffer | 5 mM EDTA 5 mM EGTA 150 mM Natriumchlorid 0,1 % (w/v) Natriumdeoxycholat 40 mM Natriumfluorid 1 % (v/v) Nonidet P40 0,1 % SDS 50 mM Tris-HCl pH 7,4 |
| Coatingpuffer | 200 mM Natriumcarbonat pH 9,6 |
| DIG-Easy Hyb | Sigma-Aldrich München, Deutschland |
| DNA-Ladepuffer | 1 Spatelspitze Bromphenolblau 30 % Glycerin in 1x TE |
| FACS-Puffer | 0,1 % BSA 0,02 % Na-Azid in PBS |
| HBS-Puffer (2x) | 10 mM Calciumchlorid 12 mM Dextrose-H ₂ O 1,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid pH 7,05 |
| Laemmlipuffer | 40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,04 % Pyronin Y 12 % (w/v) SDS 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 |
| Laufpuffer (10x) | 1,9 M Glycin 0,25 M Tris |
| Laufpuffer (1x) | 10 % 10x Laufpuffer 0,1 % SDS |

| | |
|---------------------------|--|
| Luc Lyse Puffer | New England Biolabs Frankfurt a.M., Deutschland |
| MACS-Puffer | 0,5 % BSA 2 mM EDTA in PBS |
| Maleinsäurepuffer | 0,1 M Maleinsäure (pH 7,5) 0,15 M NaCl |
| Methylcellulose | 8,8 g Methylcellulose 360 ml H ₂ O autoklaviert |
| P1 | 6,06 g/l Tris(-Base) 3,72 g/l NA ₂ EDTA 100 mg/l RNase pH 8 |
| P2 | 8 g/l NaOH 10 g/l SDS |
| P3 | 294,5 g/l Kaliumacetat 150 ml Eisessig |
| PBBS | 0,14 g/l Calciumchlorid 1,0 g/l Glucose 0,32 g/l Kaliumchlorid 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat 1,15 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat 7,2 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,2 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat 1 % Phenolrot |
| PBS/BSA/Azid | 1 mM Natriumazid 5 g/l BSA in PBS |
| Permeabilisierungspuffer | 0,5 % Saponin in PBS/BSA/Azid |
| 10x Phosphatpuffer | 0,17 M Kaliumdihydrogenphosphat 0,72 M di-Kaliumhydrogenphosphat |
| SB-Denaturierungspuffer | 0,5 M NaOH 1,5 M NaCl |
| SB-Neutralisierungspuffer | 0,5 M Tris/HCl pH 7,5 3 M NaCl |
| 20x SSC | 1,5 M NaCl 0,15 M Trinatriumcitratdihydrat |

| | |
|----------------------------|---|
| Strippinglösung | 0,2 M NaOH 0,1 % (v/v) SDS |
| TBST | 50 mM Tris-Cl 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 pH 7,5 |
| 1x TE | 0,5 ml 100x TE 45 ml H ₂ O |
| Transferpuffer | 20 % Ethanol, vergällt 96 % 10 % 10x Laufpuffer 0,05 % SDS |
| VSb-Saccharose-Kissen | 15% Saccharose 50 mM Tris /HCl 12 mM KCl 5 mM EDTA pH 7,8 |
| Waschpuffer (ELISA) | 0,5 % Tween20 in PBS |
| Waschpuffer (Western Blot) | 0,1 % Tween20 in PBS |

2.6 Medien

| | | |
|--|---|---------------------------|
| Advanced DMEM | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| DMSO-haltiges Einfriermedium | 40 % FCS 20 % DMSO 40 % RPMI 1640 oder DMEM | |
| Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| LB-Medium | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| L-Glutamin | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| 10x MEM | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| Methylzellulose-haltiges Medium | 360 ml Methylcellulose-Lösung 40 ml 10 x MEM 20 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml 200 mM L-Glutamin 20 ml NaHCO ₃ (55 g/l) | |

| | | |
|-----------|---|------------------|
| R10 | 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 20 mM HEPES in RPMI 1640 | |
| RPMI 1640 | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| TB-Medium | 1,2 % Bacto Peptone 2,4 % Hefe Extrakt 0,4 % Glycerol | |

2.7 Antibiotika

| | | |
|-------------------------|----------------|--------------------------|
| Carbenicillin | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Chloramphenicol | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Ciprofloxacin | Fresenius Kabi | Bad Homburg, Deutschland |
| Gentamycin | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Kanamycin | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin | PAA | Pasching/Österreich |

2.8 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Biomers* bezogen. Die Stock-Konzentration von 100 pmol/µl wurde laut Herstellerangaben mit Nuklease-freiem Wasser eingestellt. Die Arbeitskonzentration betrug 10 pmol/µl.

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Leader-Gag (<i>sense</i>) | ATGGGCCAGGCTGTTACCAC |
| Leader-Gag (<i>antisense</i>) | GCATGCCTGCAGGTTTAAAC |
| Leader-Gag-HindIII (<i>sense</i>) | AAGCTTATGACGAGTTCGAGACACCC |
| Leader-Gag-XhoI (<i>antisense</i>) | CTCGAGGTTTAAACAGTCGACTTACTAATC |
| Env (<i>sense</i>) | TCTAGAACCCCGCTGGAAAG |
| Env (<i>antisense</i>) | AGATCAGCTTGCATGCCTGC |

2.9 Labor-Kits

| | |
|---------------------------------------|----------------|
| Legendplex T Helper Cytokine Panel | BioLegend |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean up | Macherey-Nagel |
| NucleoSpin Plasmid | Macherey-Nagel |
| Whatman™ TurboBlotter Transfer System | Thermo Fisher |

2.10 Plasmide

| | |
|-------------------------------|--|
| pAdTrack-mIL2 | kodiert murines IL2 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [10] |
| pAdTrack-mIL12 | kodiert murines IL12 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [10] |
| pAdTrack-mIL15 | kodiert murines IL15 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [10] |
| pAdTrack-mIL21 | kodiert murines IL21 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [10] |
| pAdTrack-mGM-CSF | kodiert murines GM-CSF (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [10] |
| pCG-env | kodiert F-MuLV Env (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [16] |
| pCG-Leader-Gag | kodiert F-MuLV Gag (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [16] |
| pCG-Leader-Gag _{C1K} | kodiert F-MuLV Gag mit einer Aminosäuresubstitution (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [45] |
| pV-matIL-1 β | kodiert murines IL1 β (erhalten von Prof. Dr. Matthias Tenbusch, Ruhr-Universität Bochum) [16] |
| pV-premIL-18-ollas@3 | kodiert murines IL18 (erhalten von Prof. Dr. Matthias Tenbusch, Ruhr-Universität Bochum) [16] |
| pV-mIL-28A-olla-new | kodiert murines IL28A (erhalten von Prof. Dr. Matthias Tenbusch, Ruhr-Universität Bochum) [16] |

2.11 Sonde

| | |
|--------------------|---|
| DIG- α -Zeo | Digoxigenin-gelabelte DNA-Sonde gegen die Zeocin-Resistenzkassette (erhalten von Dr. Vu Thuy Khanh Le-Trilling) |
|--------------------|---|

2.12 Bakterienstämme

| | | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 5-alpha Competent <i>E.coli</i> | New England Biolabs | Frankfurt a.M., Deutschland |
| DH10-B | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |
| stbl2 Competent <i>E. coli</i> | Thermo Fisher | Waltham, MA, USA |

2.13 Zellen

| | |
|---------------------------|--|
| CIM | Krisen-immortalisierte MEF-Zellen (<i>mouse embryo fibroblast</i> ; MEF) [101] |
| H48 | Hybridoma Zelllinie, die einen neutralisierenden Antikörper gegen FMuLV Env produziert |
| H720 | Hybridoma Zelllinie zur Herstellung des FMuLV Env-spezifischen Antikörpers 720 |
| MEF | Murine, embryonale Fibroblastenzelllinie |
| Mus dunni (ATCC CRL-2017) | Murine Fibroblastenzelllinie |

2.14 Viren

| | |
|---------------|---|
| MCMV.env | Rekombinantes MCMV, das das Oberflächenprotein Env von FV kodiert und eine Deletion in m157 trägt [38] (erhalten von Dr. Vu Thuy Khanh Le-Trilling) |
| MCMV.parental | Standard MCMV (Smith Stamm) [113], das eine Deletion in m157 von MCMV trägt |
| F-MuLV | F-MuLV Helfervirus (erhalten von Dr. Wibke Bayer) |
| FV | Komplex aus F-MuLV und dem <i>spleen focus forming virus</i> (SFFV) (erhalten von Dr. Wibke Bayer) |

2.15 Größenstandards

Um die Größe von DNA-Fragmenten in der Gelelektrophorese bestimmen zu können, wurden zwei verschiedene Größenstandards der Firma Thermo Scientific herangezogen. Bei kleineren DNA-Fragmenten wurde der *GeneRuler™ 50bp DNA Ladder* verwendet und bei größeren Fragmenten der *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*.

2.16 Mäusstämmen

| | | |
|---------|----------------------------|-----------------------|
| Balb/c | Harlan Laboratories | Rossdorf, Deutschland |
| C57BL/6 | Harlan Laboratories | Rossdorf, Deutschland |
| CB6F1 | Charles River Laboratories | Sulzfeld, Deutschland |
| | Harlan Laboratories | Rossdorf, Deutschland |

2.17 Antikörper

| | | |
|---------------------------------------|--|--------------------------------|
| AK 48 | Antikörper der Hybridomazelllinie H48 [24] | |
| AK720 | Antikörper der Hybridomazelllinie H720 [104] | |
| α -mouse CD4 Micro Beads | Miltenyi Biotec | Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| α -mouse CD28 (Klon: 37.51)D | eBioscience | Frankfurt, Deutschland |
| α -mouse CD3e (Klon: 145-2C11) | eBioscience | Frankfurt, Deutschland |
| α -mouse IgG1 HRP | BD | Heidelberg, Deutschland |
| Esel α -mouse HRP | Dianova | Hamburg, Deutschland |
| PE-MHCI H-2D ^b mit FV GagL | Beckmann Coulter | Krefeld, Deutschland |
| Ziege α -mouse HRP | Dako | Hamburg, Deutschland |

2.18 Fluoreszenzmarkierte Antikörper und Tetramere

Alle in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierte Antikörper stammen von den Firmen BioLegend (Koblenz, Deutschland), BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) oder eBioscience (Frankfurt, Deutschland).

Alexa Fluor 700 (AF700)- α -CD4, AF700- α -CD44

APC-MHCII mit FV CD4 Peptid (EPLTSLTPRCNTAWNRLKL)

Allophycocyanin (APC)- α -GzmB, APC- α -IL4, APC- α -TNFR1I, APC- α -IL2

eFluor 450 (eF450)- α -CD8, eF450- α -IL2

eFluor 605 (eF605)- α -CD4

eFluor780 (eF780)-Fixable Viability Dye (messbar im APC-Cy7-Kanal)

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- α -CD11b, FITC- α -IFN γ

Peridin-Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP)- α -CD43

PE-MHCI H-2D^b mit FV GagL (AbuAbuLAbuLTVFL)

Phycoerythrin-Cyanin7 (PE-Cy7)- α -CD62L, PE-Cy7- α TNF α , PE-Cy7- α CD4

2.19 Peptide

| | | |
|-------------------------|---------------------|---|
| MCMV Peptid M45 [40] | HGIRNASFI | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| MCMV Peptid M57 [40] | SCLEFWQRV | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| MCMV Peptid M102 [40] | SIVDLRFAVL | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| MCMV Peptid m139 [40] | TVYGFCLV | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| MCMV Peptid m141 [40] | VIDAFSRL | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV Env 122-141 [81] | EPLTSLTPRCNTAWNRLKL | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV Env 57-71 [81] | ETVWAI SGNHPLWTW | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV Env 91-105 [81] | GLEYPYSSPPGPP | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV Env 415-430 [81] | KGSYYLVAPAGTMWAC | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV Env 267-281[81] | PRVPIGNPVLADQL | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV Env 277-291 [81] | LADQLSFPLPNPLPK | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |
| F-MuLV GagL [23] | AbuAbuLAbuLTVFL | peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland |

2.20 Datenbanken

National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Für DNA- und RNA-Sequenzen

2.21 Software

| | |
|------------------------|--------------------------|
| End Note | Clarivate Analytics |
| Flow Jo V10 | FlowJo, LLC |
| Graph Pad Prism V6 | Graph Pad Software, Inc. |
| Legendplex | BioLegend |
| Vector NTI Advance V11 | Invitrogen |

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Oligonukleotiddesign

Um einzelsträngige Oligonukleotide erstellen zu können, musste zuerst die Sequenz des ausgewählten Gens aus der Datenbank NCBI abgerufen werden. Mit Hilfe des Programms *Vector NTI* wurden die Oligonukleotide erstellt. Die erstellten Oligonukleotide sollten dabei eine Länge von 18-30 Basen haben und einen Anteil von 40-60 % Guanin und Cytosin (G+C) aufweisen. Die Schmelztemperatur sollte 55-80 °C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben. Die Sequenz sollte möglichst spezifisch sein für das gewünschte Amplifikationsprodukt, so dass die Oligonukleotide nur an der richtigen Stelle binden, auch das wurde mit dem Programm *Vector NTI* überprüft.

3.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe dieser Methode können spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Doppelsträngige DNA wird dabei zunächst durch Erhitzen auf 95 °C getrennt, wodurch spezifische DNA-Stücke, sogenannte Oligonukleotide, sich flankierend an die zu amplifizierende DNA-Sequenz anlagern können. Diese Oligonukleotide dienen als Startpunkt für thermostabile DNA-Polymerasen. Diese Enzyme wurden ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und benötigen die 3' Hydroxylgruppe der Oligonukleotide als Startpunkt für die Verknüpfung mit weiteren Desoxyribonukleotid-triphosphaten (dNTPs) und somit für die Amplifikation der Zielsequenz. Die entstandenen DNA-Abschnitte dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize für weitere Amplifikationen. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgt in mehreren Zyklen, von denen jeder aus drei Phasen besteht. Die erste Phase dient der Denaturierung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzen. In der nächsten Phase wird die Temperatur verringert, wodurch die Oligonukleotide mit der einzelsträngigen DNA hybridisieren. In der folgenden Elongationsphase wird durch das Anfügen von dNTPs die Oligonukleotidsequenz verlängert [87]. Die Länge der Elongationsphase ist abhängig von der verwendeten Polymerase. Die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert bei einer Elongationstemperatur von 72 °C in 20-30 Sekunden ein Amplifikat von 1 kb und wird wegen ihrer verbesserten Korrekturleseigenschaften verwendet.

Tabelle 1: PCR Ansatz

| Bezeichnung | Menge/Volumen |
|------------------------------------|---------------|
| 5x Q5 Reaktions Puffer | 10 μ l |
| 10 mM dNTPs | 1 μ l |
| Vorwärts-Primer (1 pmol/ μ l) | 10 μ l |
| Rückwärts-Primer (1 pmol/ μ l) | 10 μ l |
| Plasmid | 30 ng |
| Q5 High-Fidelity DNA Polymerase | 0,5 μ l |
| Wasser | ad 50 μ l |

Die PCR wurde mit den zuvor erhaltenen Oligonukleotiden und nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2: PCR Ansatz

| Schritt | Temperatur | Dauer | Wiederholung |
|----------------------------|------------|------------|--------------|
| Denaturierung (initial) | 98 °C | 30 s | |
| Denaturierung | 98 °C | 10 s | } 35 x |
| <i>Annealing</i> | 50-72 °C | 10-30 s | |
| Elongation | 72 °C | 20-30 s/kb | |
| Elongation (final) | 72 °C | 2 min | |
| Pause | 4 °C | ∞ | |

3.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese. Die Gelmatrix entsteht dabei durch die Aggregation und Vernetzung von Agarosepolymeren zu einem feinporigen Gel. Die Fragmente bewegen sich abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Poren des Gels. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner sind die Poren. Die Größe der Fragmente wird durch den Vergleich mit Strängen bekannter Größe bestimmt.

Sowohl für den Laufpuffer, als auch für das Agarosegel wurde TAE-Puffer verwendet. Abhängig von der Fragmentgröße wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8-2 % (w/v)

verwendet. Die Agarose wurde in einer Mikrowelle mit TAE-Puffer aufgeköcht bis diese sich vollständig gelöst hatte. Der Agaroselösung wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel luftblasenfrei in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Die aufzutragenden Proben wurden mit 1:6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt, gemischt und anschließend aufgetragen. Zum Vergleich der Fragmentgröße wurde ein 1kb-Leiter oder ein 50 bp-Leiter verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einer Gelkammer mit einer konstanten Spannung von 5 V/cm bei Raumtemperatur. Nachdem die Trennung erfolgt war, wurden die Gele mit Hilfe einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert. Die Detektion der DNA-Fragmente wird durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren und der damit verbundenen Änderung des Absorptionsspektrums ermöglicht. Bei Anregung des Ethidiumbromids durch UV-Licht (245 nm) beginnen die Banden zu fluoreszieren und können dann dokumentiert werden. Bei Bedarf wurden anschließend Fragmente bestimmter Größe aus dem Gel ausgeschnitten.

3.1.4 Herstellung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die ursprünglich aus verschiedenen Bakterien isoliert wurden und die spezifisch palindromische Sequenzen auf einzel- oder doppelsträngigen DNA-Strängen erkennen und diese Stränge dort spalten. Bei der Spaltung können abhängig vom Enzym unterschiedliche Enden entstehen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden mit dem jeweils mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Der Restriktionsverdau des Vektors und der DNA-Fragmente erfolgte in 100 µl bei 37 °C. Die Fragmente wurden anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean up* Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.1.5 Ligation

Bei der Ligation wird das DNA-*insert* mit dem Vektor verknüpft. Mit Hilfe einer T4-Ligase, die ursprünglich aus dem Bakteriophagen T4 isoliert wurde, und sowohl glatte, als auch überhängende Restriktionsenden verknüpfen kann, wurde die Ligation durchgeführt. Der Ansatz aus Tabelle 3 enthielt immer den Vektor und das DNA-*insert* im Verhältnis 1:4.

Tabelle 3: Ligationsansatz

| Bezeichnung | Volumen/Menge |
|---------------------|----------------------|
| Vektor | 2 µl (bei 100 ng/µl) |
| DNA- <i>insert</i> | 8 µl (bei 100 ng/µl) |
| 10x Ligationspuffer | 1,5 µl |
| T4-Ligase | 1 µl |
| H ₂ O | 2,5 µl |

Im Kontrollansatz wurde das DNA-*insert* durch Wasser ersetzt. Der Ansatz wurde anschließend für 2 h bei RT inkubiert oder bei 4 °C über Nacht.

3.1.6 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Nach der Ligation wurde das entstandene Konstrukt in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, um das Plasmid zu vermehren. Der komplette Ligationsansatz wurde dabei auf 50 µl Bakterien gegeben und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Dann wurde 250 µl SOC-Medium zugegeben und die Suspension für eine Stunde auf dem Schüttler bei 250 rpm und 32 °C für stbl2 und bei 37 °C für DH5α-Bakterien inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend zur Selektion auf antibiotikahaltigen Agar-Platten ausgestrichen und üN bei ihrer entsprechenden Temperatur inkubiert.

3.1.7 Plasmid Isolation (Mini-Prep)

Nach erfolgreicher Transformation wurden bis zu 10 Kolonien pro Agar-Platte ausgewählt und in Reagenzgläser mit 3 ml LB-Medium mit Antibiotika überführt. Diese Reagenzgläser wurden danach über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 1,5 ml des Ansatzes entnommen und die Isolation der Plasmid-DNA mit dem *NucleoSpin* Plasmid-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.8 DNA Präparation über Cäsiumchlorid-Gradienten

Um große Mengen DNA aufzureinigen wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und über Nacht in TB-Selektionsmedium vermehrt.

250 ml der Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag bei 5000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und es wurden 20 ml Puffer P2 zugegeben. Die Mischung wurde 6-mal

invertiert und für 10 min bei RT inkubiert, um die Bakterien aufzuschließen. Die Reaktion wurde durch 6-mal invertieren mit 30 ml Puffer P3 gestoppt. Die Proben wurden dann 15 min bei 12 500 g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand anschließend über angefeuchtete Faltenfilter filtriert. Dem Filtrat wurden 0,7 Vol Isopropanol zugegeben und wieder für 30 min bei 4 °C mit 12 500g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Lösung wurde mit 4,6 g Cäsiumchlorid und 40 µl Ethidiumbromidlösung versetzt und anschließend luftblasenfrei in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die bei der Ultrazentrifugation entstehende Bande wurde abgesaugt und das Volumen mit 1x TE Puffer auf 4 ml erweitert. Mit Hilfe von 3,5 ml TE-gesättigtem 2-Butanol (10% TE) wurde das Ethidiumbromid mehrfach ausgeschüttelt und die klare Phase anschließend mit 1x TE auf 5 ml erweitert, mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und bei 20 °C und 12500 g für 30 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in sterilem PBS resuspendiert.

3.1.9 Konzentrationsbestimmungen von DNA Lösungen

Die Absorption der DNA wurde bei 260 nm mit Hilfe des Nanodrop gemessen und das zugehörige Programm errechnet die Konzentration nach folgender Gleichung:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml doppelsträngige DNA}$$

3.1.10 Sequenzierung

DNA Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) durchgeführt

3.1.11 Isolierung von Bacmid-DNA

Für die Minipräparation von Bacmid-DNA wurden 10 ml einer Übernachtskultur in ein 15 ml Falcon überführt und 10 min bei 4 000 rpm (Sigma 4-16 K, Rotor 11650) und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Präzipitat in 200 µl P1-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu der Suspension wurden 300 µl P2-Puffer zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Reaktion wurde nach 5 min bei RT durch Zugabe von 300 µl P3-Puffer gestoppt und nach weiteren 5 min wurden die Proben nochmals für 10 min bei 13 500 rpm (Eppendorf 5430 R mit Rotor FA 45 30) und RT zentrifugiert um die Bacmid-DNA von den Proteinen zu trennen. Der Überstand mit der Bacmid-DNA wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 650 µl Isopropanol zugegeben und 10-mal invertiert. Die Proben wurden im Eisfach bei -20 °C für 30 min inkubiert und danach 40 min bei 13 500 rpm (Eppendorf 5430 R mit

Rotor FA 45 30) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 600 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde verworfen, das Präzipitat an der Luft getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert.

3.2.12 Southern-Blot Analyse der MCMV-Bacmid-Mutanten

Zur Analyse der MCMV-Bacmid-Mutanten wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und mit einem 0,6 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gelbild wurde anschließend unter UV-Licht dokumentiert und das Gel anschließend für 20-30 min in 250 mM HCl-Lösung gebleicht. Danach wurde dreimal kurz mit Wasser gewaschen, einmal kurz mit SB-Denaturierungslösung und dann 30 min in SB-Denaturierungslösung inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschrte mit Wasser und eine 30-minütige Inkubation des Gels mit SB-Neutralisationspuffer. Mit Hilfe des Whatman TurboBlotter Transfer Systems wurden die DNA-Fragmente nach Angaben des Herstellers ÜN mit 20x SSC auf eine Nylonmembran transferiert. Nach dem Transfer wurde die DNA mit Hilfe von UV-Strahlung auf der Membran fixiert. Die Membran wurde in eine Glasröhre überführt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Prä-Hybridisierung mit DIG-Easy Hyb bei 42 °C für eine Stunde im Hybridisierungssofen. Danach wurde die Membran abermals gewaschen und üN mit einer DIG-markierten Sonde gegen die inserierte Resistenzkassette (Zeo) oder gegen ein parentales Gen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit Wasser und Waschpuffer 1 kurz gewaschen und danach 30 min bei 68 °C in Waschpuffer 2 inkubiert. Die Membran wurde danach wieder mit DIG-Blocking-Lösung bei RT für 30 min inkubiert und anschließend erfolgte die Inkubation mit anti-DIG Antikörper für 45 min bei RT. Die Membran wurde dreimal 5 min mit 1x Maleinsäurepuffer gewaschen und nochmal mit AP-Puffer. Die Substratlösung CDP-Star wurde auf die Membran gegeben und 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Trocknen der Membran mit Whatman-Papier wurde diese in Frischhaltefolie eingeschlagen und das Lichtsignal, das durch die Dephosphorylierung des Substrats durch die Antikörper-gebundene Alkalische Phosphatase entsteht, mit Hilfe eines Fotofilms detektiert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Bei dieser Methode werden die Proteine durch das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert, d. h. die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine gehen verloren und das SDS kann sich an die Proteine anlagern und überdeckt dabei deren

Eigenladung. Die Proteine sind dadurch gleichmäßig negativ geladen und können im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Gewinnung der Proteine wurden Zelllysate mit Hilfe von Luciferase Cell Lysis Buffer (Luc-Lyse Puffer) hergestellt. Dafür wurden die virusinfizierten oder transfizierten Zellen mit einem Schaber abgeschabt und inklusive Medium in ein Eppendorf Gefäß überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Luc Lyse Puffer resuspendiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe von Bradford eingestellt. 15 µl dieser eingestellten Lysate wurden mit 5 µl Laemmli-puffer versetzt und 15 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 10 %-igen Gel (Tabelle 4) für ungefähr 2 h bei 150 V bis zum Austritt der Lauffront aus dem Gel. Als Standard wurden 8 µl des Precision Plus Dual Color Protein Standards aufgetragen.

Tabelle 4: Gel Zusammensetzung für SDS-PAGE

| | Trenngel (10 %) | Sammegel |
|-----------------------|------------------------|-----------------|
| 30 % Polyacrylamid | 16 ml | 3 ml |
| 2 M Tris/HCl | 10 ml | / |
| 0,5 M Tris/HCl | / | 2,4 ml |
| 20 % SDS (w/v) | 240 µl | 60 µl |
| 60 % Saccharose (w/v) | / | 4,2 ml |
| H ₂ O | 21,2 ml | 8,4 ml |
| TEMED | 96 µl | 24 µl |
| 10 % APS (w/v) | 500 µl | 120 µl |

3.2.2 Western Blot

Nach der Trennung der Proteine erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Für den Elektrottransfer wurde die Membran anodenseitig auf das Gel gelegt und in einer Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 100 V für 1 h geblottet. Anschließend wurde die Membran 1 h in 1x TBST mit 5% Milchpulver bei RT geblockt und danach 1 h bei RT mit dem Primärantikörper verdünnt in 1x TBST mit 5% Milchpulver inkubiert. Die Membran wurde mehrfach mit 1x TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper verdünnt in 1x TBST mit 5 % Milchpulver erfolgte für mindestens 45 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran dreimal

10 min mit 1x TBST gewaschen und die Detektionslösung 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Erhaltende Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte abhängig vom Zelltyp in unterschiedlichen Nährmedien. Die Inkubation und Vermehrung erfolgte bei 37 °C mit einer Atmosphäre von 5% CO₂ bei 90% relativer Luftfeuchte. Da die Vermehrung und das Wachstum der Zellen abhängig von der Flaschengröße räumlich begrenzt ist, wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und adhärente Zellen mit 1x Trypsin/EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst und in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Neubauer Kammer gezählt und die erforderliche Zellzahl wieder in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt.

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurden adhärente Zellen zunächst mit 1x Trypsin/EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst, danach wurde Medium dazugegeben und die Zellen mit 1000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in FBS mit 10 % DMSO resuspendiert, aliquotiert und zunächst in einem Isolierbehälter bei –80 °C über Nacht langsam eingefroren und dann in einen Stickstofftank bei -193 °C gelagert.

Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Zellen mit 20 ml Medium gewaschen und anschließend wieder in ihrem entsprechenden Medium resuspendiert und kultiviert.

3.4 Virologische Arbeiten

3.4.1 Rekonstitution von MCMV-Viren aus Bacmid-DNAs

In einer 6-Loch Platte wurden am Vortag MCMV-permissive CIM-Zellen ausgesät und für jede Transfektion 20 µl der Bacmid-DNA mit 80 µl DMEM gemischt. Nach Zugabe von 10 µl SuperFect-Reagenz wurde die Transfektionslösung 10 s gevortext, kurz anzentrifugiert und 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den zu transfizierenden Zellen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach 10 min wurden 400 µl DMEM mit 1x Penicillin und Streptomycin, 2x Ciprofloxacin und 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) (im Folgenden DMEM^{+/+/+}) zu der Transfektionslösung zugegeben, durchmischt und auf die Zellen gegeben. Nach 2-3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Transfektionsmedium

abgesaugt und durch 2 ml frisches DMEM^{+/+/+} ersetzt und weiter inkubiert. In den folgenden Tagen wurde das Medium teilweise gewechselt und die Zellen auf größere Flaschen bis T175 expandiert. Trat ein cytopathischer Effekt (CPE) ein, konnte von einer erfolgreichen Rekonstitution ausgegangen werden.

3.4.3 Herstellung eines gereinigten MCMV-Stocks

In drei 6-Loch Platten und gleichzeitig in 18 T175-Zellkulturflaschen wurden MCMV-permissive Zellen angelegt. Die Zellen in den 6-Loch Platten wurden am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 70-80 % mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) zwischen 0,1 und 0,3 mit MCMV infiziert. Dazu wurde das Medium durch 3 ml Virusverdünnung (DMEM^{+/+/+} mit MCMV) ersetzt und die Platten für 15 min bei 2 000 rpm und RT zentrifugiert, um 180° gedreht und wieder zentrifugiert, um eine Annäherung der Zellen und des Virus zu gewährleisten. Ein CPE war meist nach 2-3 Tagen zu beobachten und die Zellen und das Medium aus den 6-Loch Platten wurden gesammelt und jeweils in eine der zuvor angelegten T175-Flaschen überführt. Nach 6-9 Tagen der Infektion und bei ausgeprägtem CPE wurden die Zellen abgeschabt und mit dem Medium in sterile Zentrifugenbecher überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 6 000 rpm und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 5 ml pro Becher gesammelt, das Pellet in 5 ml resuspendiert und in einem *Douncer* aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen und der Überstand wurden wieder in Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 6 000 rpm (Beckman Coulter Avanti J-26 XP, Rotor O7U-762) und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in sterile Zentrifugenbecher überführt und 4 h bei 10 000 rpm und 10 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, auf das Präzipitat 5 ml DMEM gegeben und über Nacht auf Eis bei 4 °C inkubiert, da es sehr schwer löslich ist. Am nächsten Tag wurde das Präzipitat im vorhandenen Medium resuspendiert und in einem *Douncer* homogenisiert. Die Suspension wurde langsam auf ein VSB-Saccharose-Kissen in einem Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und 70 min bei 27 000 rpm (Beckman Coulter Optima L-80 XP, Rotor NVT 90) und 10 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und auf jedes Präzipitat wurden 1 ml VSB-Saccharose Lösung gegeben und über Nacht auf Eis bei 4 °C gelöst. Am nächsten Tag wurde das isolierte Virus in einem kleinen *Douncer* homogenisiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.4.4 Titration von MCMV

Für die Bestimmung der Virustiter eines gereinigten MCMV Stocks wurden MEFs in 24-Loch Platten angelegt. Diese wurden mit einer sequenziellen 1:10 Verdünnungsreihe der

Virussuspension durch Zentrifugation (s. 3.4.3) infiziert und 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Methylzellulose-haltigem Medium überschichtet, die durch Zell-zu-Zell Infektion entstandenen Plaques wurden 3 Tage nach der Infektion gezählt, um die *plaque forming units* (pfu) pro ml zu berechnen.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 DNA-Vakzinierung

Bei der Immunisierung erhielten die CB6F1-Mäuse 25 µg Plasmid-DNA. Die Mäuse wurden für die Immunisierung mit dem Schmerzmittel Ketamin in Kombination mit dem Sedativum Xylazin betäubt. Die Applikation der DNA erfolgte in 30 µl in den *M. gastrocnemius* mit anschließender Elektroporation des Muskels, um die Aufnahme der DNA durch die Muskelzellen zu gewährleisten.

Tabelle 5: Elektroporationsprotokoll modifiziert nach Roos *et al.* [107].

| Gruppe | Impuls- Amplitude | Impuls- Breite | Impuls- Intervall | Gruppen- Intervall | Impuls- Anzahl |
|--------|----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 450 V (1125 V/cm) | 0,05 ms | 0,2 ms | 50 ms | 2 |
| 2 | 110 V (275 (V/cm) | 10 ms | 20 ms | 50 ms | 8 |

3.5.2 MCMV-Vakzinierung

Für die Impfung mit MCMV wurde CB6F1-Mäusen 2x10⁵ pfu intraperitoneal injiziert. Die Immunisierung erfolgte einmalig oder in einem homologen Prime-Boost-Schema im Abstand von drei Wochen.

3.5.3 Belastungsinfektion mit FV

Die Belastungsinfektion der CB6F1-Mäuse erfolgte nach der Immunisierung mit 500 oder 5000 *spleen focus forming units* (SFFU) FV in 100 µl PBS durch intravenöse (i.v.) Injektion.

3.5.4 Retroorbitale Blutentnahme

Den Mäusen wurden unter Inhalations-Isofluran-Narkose 6-8 Tropfen Blut (ca. 200 µl) retroorbital entnommen. Das Blut wurde in Reaktionsgefäßen mit gerinnungshemmenden

2,5 µl Heparin(1000 U/ml) aufgefangen. Das Plasma wurde durch Zentrifugation bei 1 000 g für 10 min von den Blutzellen getrennt und eingefroren.

3.5.5 Größenbestimmung der Milz während der FV-Infektion

Nach der Infektion der Mäuse mit FV wurde der Krankheitsverlauf durch zweimal wöchentliches palpieren der Milzen überprüft. Die Mäuse wurden für die Palpation durch eine Inhalations-Isofluran-Narkose betäubt und die Milzgröße abgetastet. Die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Die Kategorien entsprechen unterschiedlichen Milzgewichten: 1: bis 0,5 g; 2: 0,6-1,2 g; 3: 1,2-1,7 g und 4: ab 1,7 g.

3.5.6 Virämie-Assay

Zur Bestimmung der Virämie im Plasma wurden den Mäusen 10 Tage nach der Infektion mit FV etwa 200 µl Blut retroorbital abgenommen und durch Zentrifugation das Plasma gewonnen. In einer 96-Loch Platte wurden in die erste Vertiefung 100 µl PBS und in fünf folgende 80 µl PBS vorgelegt. Von dem gewonnen Plasma wurden 10 µl in die erste Vertiefung gegeben, gemischt und jeweils 40 µl der Verdünnungen in die nächsten Vertiefungen weiter verdünnt. Am Vortag wurden 24-Loch Platten mit 7 500 Zellen pro Vertiefung *Mus dunni* Zellen ausplattiert und am Versuchstag wurden 25 µl Polybren (80µg/ml) zugegeben. Von den sechs Plasma-Verdünnungsstufen pro Tier wurden jeweils 50 µl auf die 24-Loch Platte übertragen und die Zellen 3 Tage bis zur Konfluenz inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen 5 min mit 96 %igem Ethanol fixiert und anschließend zweimal mit PBS mit 0,1 % BSA gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit jeweils 200 µl AK720 für mindestens 1h bei RT zur Bindung des Antigens. Die Platten wurden wieder gewaschen und mit 200 µl/Vertiefung HRP-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-α-Mouse (1:400 in PBS verdünnt) für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Vor der Detektion wurden die Platten wieder zweimal gewaschen und jeweils 500 µl AEC-Gebrauchslösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte bis Foki in Form von roten Punkten sichtbar wurden mit deren Hilfe die Anzahl Fokus-bildender Einheiten (*focus-forming units*; FFU) pro ml Plasma bestimmt werden konnte.

3.5.7 ELISA zur Bestimmung bindender Antikörper

Zur Bestimmung der bindenden Antikörper im Serum wurde eine 96-Loch MaxiSorp Platte mit 0,5 µg FV-Antigen über Nacht bei 4 °C in 100 µl Coatingpuffer pro Vertiefung beschichtet. Anschließend wurde die Platte mit 300 µl PBS mit 0,1 % Tween 20 fünfmal

gewaschen und mit 300 µl PBS mit 10 % FCS pro Vertiefung bei RT für 30 min geblockt. Die Plasmaproben wurden in einer separaten 96-Loch Platte in einer Verdünnungsreihe verdünnt. In der ersten Vertiefung wurden 135 µl PBS mit 10% FCS, in jede weitere 120 µl, vorgelegt. In die erste Vertiefung wurden 15 µl Plasma gegeben und die Verdünnungsreihe schrittweise mit 30 µl aus der vorangegangenen Vertiefung fortgesetzt, so dass sechs Verdünnungsstufen entstanden. 100 µl dieser Verdünnungen wurden anschließend auf die geblockte MaxiSorp Platte übertragen und 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde anschließend wieder fünfmal gewaschen und mit 100 µl des Zweitantikörpers 1h bei RT inkubiert. Beim Zweitantikörper handelte es sich um einen HRP-gekoppelten Antikörper Esel anti-Maus IgG der 1:15 000 in PBS mit 10% FCS verdünnt wurde. Es folgten erneut fünf Waschschriffe und die Entwicklung mit 100 µl TMB + Substrat pro Vertiefung bis zur Blaufärbung der Proben. Die Reaktion wurde mit 1 N Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption in einem Plattenreader bei 450 nm gemessen. Als positiv galten Proben, deren optische Dichte zweimal so hoch war, wie die der naiven Mäuse. Deren Antikörper-Titer wurde anhand der Verdünnungsstufe bestimmt.

3.5.8 Neutralisierende Antikörper gegen FV

Der Nachweis neutralisierender Antikörper erfolgte aus dem Plasma an Tag 10 der Belastungsinfektion. Das Virus im Plasma wurde zuerst bei 56 °C für 30 min inaktiviert und das Virus dann in einer 96-Loch Platte in der ersten Vertiefung 1:4 und in den folgenden fünf Vertiefungen weiter 1:2 in PBS verdünnt. In den Vertiefungen unter der Verdünnungsreihe wurden pro Vertiefung 15 µl einer F-MuLV-Verdünnung mit 10 µl einer 1:3 Verdünnung von Meerschweinchen-Komplement gemischt und 15 µl der zuvor angelegten Plasmaverdünnungen wurden hinzugefügt und gemischt. Die gewählte FMuLV-Verdünnung sollte in der Negativkontrolle mit PBS wegen der Abwesenheit neutralisierender Antikörper etwa 30-60 Foki bilden. Der Antikörper 48 diente als Positivkontrolle. Nach 1 h bei 37 °C wurden die Ansätze auf am Vortag ausgelegte 24-Loch Platten mit 7500 *Mus dunni*/Vertiefung, die 1h zuvor mit 25 µl Polybren/Vertiefung behandelt wurden, überführt. Die Zellen wurden drei Tage bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen inkubiert und danach wie beim Virämie-Assay beschrieben fixiert und gefärbt. Neutralisation wurde angenommen, wenn die Foki um mindestens 75% reduziert waren.

3.5.9 IC-Assay

Pro Tier wurde am Vortag eine 6-Loch Platte mit 20 000 *Mus dunni* Zellen/Vertiefung ausgelegt. Die Mäuse wurden an Tag 21 nach der Belastungsinfektion durch cervikale

Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Die Milzen wurden einzeln gewogen und mit 10 ml PBBS in Zellsieben zerrieben und die Zellsuspension in 50 ml-Gefäßen gesammelt. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe eines Zellzählers bestimmt und auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. In einer 24-Loch Platte wurden pro Vertiefung 1,8 ml Medium vorgelegt und in die erste jeweils 200 µl der eingestellten Zellsuspension gegeben. Die Verdünnung wurde mit jeweils 200 µl weitergeführt und jeweils 1 ml der Verdünnungsreihe auf die 6-Loch Platte mit den Zellen überführt. Die Zellen wurden drei Tage bis zu Konfluenz inkubiert und mit Ethanol fixiert. Die Färbung und Detektion der infizierten Zellen erfolgte wie für das Virämie-Assay beschrieben. Vom den Antikörpern wurden jeweils 800 µl verwendet und von der AEC-Gebrauchslösung 2 ml pro Vertiefung. Die Anzahl der infektiösen Zentren konnte mit Hilfe der gezählten roten Foki pro Verdünnungsstufe berechnet werden.

3.5.10 Bestimmung der zellulären Immunantwort

3.5.10.1 Probenvorbereitungen

Färbungen wurden sowohl mit Milzzellen, als auch mit Blutzellen durchgeführt. Für die Färbung von Milzzellen wurden Zellen aus den Einzelzellsuspensionen (s. 3.5.9) verwendet. Die Blutzellen wurden vor der Färbung lysiert, dazu wurde das abgenommene Blut mit 5 ml ACK-Lysispuffer versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml PBS abgestoppt und die Proben 8 min bei 1 500 rpm (Sigma 4-16 K, Rotor 11650) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgeschüttet und die Zellen im verbleibenden Restvolumen resuspendiert. Die Zellen wurden für die FACS-Färbungen auf 96-Loch Platten verteilt.

3.5.10.2 Stimulation mit GagL-Peptid

Für die Stimulation wurden pro Vertiefung 200 µl R10-Medium mit 2 µg/ml BFA und 1 µg/ml F-MuLV GagL-Peptid AbuAbuLAbuLTVFL auf die Blutzellen gegeben. Das Abu-modifizierte Peptid enthält Aminobuttersäure (Abu) anstatt der ursprünglichen Cysteine (CCLCLTVFL), um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern [23]. Die unstimulierten Kontrollen erhalten nur das Medium mit BFA. Die Stimulation erfolgt im Brutschrank für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.5.10.3 Stimulation mit MCMV-Peptiden

Für die Stimulation werden pro Vertiefung 200 µl RPMI-Medium mit 2 µg/ml BFA, 0,04 U/well humanes IL2 und 1 µg/ml der MCMV-Peptide M45, 57, 102, 139, 141 auf die

Blutzellen gegeben. Die unstimulierten Kontrollen erhalten nur das Medium mit BFA. Die Stimulation erfolgt im Brutschrank für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.5.10.4 Oberflächenfärbung

Für eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit Hilfe eines Durchflusszytometers können Zellen sowohl auf ihrer Oberfläche, als auch intrazellulär gefärbt werden. Für die Färbung bestimmter Oberflächenproteine wurden die Zellen in der 96-Loch Platte nochmals zentrifugiert und anschließend wurden 50 µl der in FACS-Puffer verdünnten Antikörper (meist 1:200) auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden für 30-60 min bei RT im Dunkeln inkubiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

3.5.10.5 Intrazelluläre Färbung

Nach der Färbung wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd 20 min bei RT im Dunkeln fixiert. Anschließend wurde die Platte nochmal zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Antikörper in Permeabilisierungspuffer (PERM-Puffer) verdünnt und davon 50 µl auf die fixierten Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Perm-Puffer gewaschen und konnten in FACS-Puffer im Durchflusszytometer gemessen werden.

3.5.10.6 Tetramerfärbung

Um T-Zellen zu analysieren, die für bestimmte Peptide spezifisch sind, wurde die Tetramer-Technologie entwickelt [4]. Diese Tetramere bestehen aus einem Fluorochrom-gekoppelten

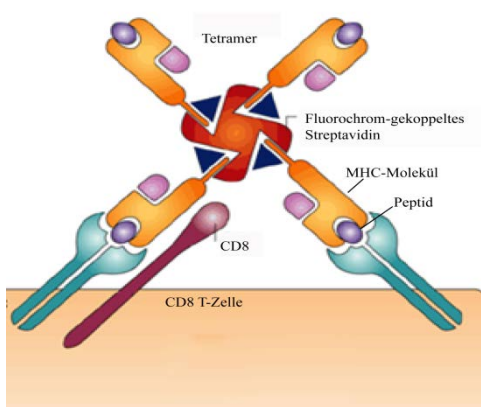


Abbildung 5 MCH I-Tetramer.

An das Fluorochrom-gekoppelte Streptavidin ist ein Peptid-beladenes MHC I-Molekül gekoppelt, das an den TCR der CD8 T-Zelle bindet[70].

Streptavidin, an das Peptid-beladene MHC I- oder MHC II-Moleküle gebunden sind. Dieser Komplex kann an für das gebundene Peptid spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf der Oberfläche von T-Zellen binden. Diese T-Zellen können dann mit dem Durchflusszytometer erfasst und quantifiziert werden. Die Analyse von MHC I- und MHC II-Tetramerantworten erfolgte in Blutzellen. Die Analyse der MHC I-Antworten erfolgte wie in der Oberflächenfärbung (vgl. 3.5.9.3) beschrieben und das Tetramer wurde 1:100 verdünnt.

Das MHC-II Tetramer wurde in RPMI Medium mit 10% FCS, 1 x Penicillin/Streptavidin und 1 x L-Glutamin (im Folgenden RPMI^{+/+/+}) verdünnt. Das Tetramer wurde in der Färbung 1:100 in 25 µl RPMI^{+/+/+} pro Vertiefung verdünnt und die Platte wurde 2,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden der Färbung pro Vertiefung 10 µl der gewünschten Oberflächenantikörper zugegeben und nochmal 30 min inkubiert, danach wurde die Platte zweimal gewaschen und die Proben konnten anschließend analysiert werden.

3.5.10.7 Zellisolation mit der MACS-Technologie

Für die Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten und der Milz wurden die Organe entnommen und die Lymphknoten mit 5 ml PBBS und die Milzen mit 10 ml PBBS einzeln zerrieben (s. 3.5.9). Die Zellsuspensionen wurden 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 90 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert und pro 10⁷ Zellen wurden 10 µl α -mouse CD4 Micro Beads zugegeben. Die Suspension wurde bei 4 °C für 15 min inkubiert, mit 10 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen und danach mit 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch ein 30 µl Zellsieb filtriert bevor sie in den AutoMACS Pro Separator eingesetzt wurden. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben separiert und sowohl die CD4⁺ T-Zellen, als auch alle restlichen Zellen (CD8⁺, Makrophagen, DC etc.), aufgefangen.

3.5.10.7 Zell-Transfer

Nach der Zellisolation mit der MACS-Technologie wurden die isolierten Zellpopulationen intravenös in CB6F1-Mäuse appliziert. Dazu wurden die Zellen mit 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend in 300 µl PBS mit 3 µl Heparin (1000 U/ml) resuspendiert.

3.6 Statistische Analysen

Statistische Analysen und graphische Darstellungen wurden mit Graph Pad Prism Version 6 erstellt. Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test ermittelt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) mit Kruskal Wallis und Dunn's Post-Test gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Prophylaktische DNA-Immunisierung

4.1.1 Modulation der supprimierenden Effekte von F-MuLV Env

Viele Mikroorganismen, einschließlich Retroviren, unterdrücken das Immunsystem des infizierten Wirts, um eine Infektion aufrechtzuerhalten. Retroviren induzieren supprimierende Effekte durch ihre Oberflächenproteine (Env), wahrscheinlich durch eine immunsuppressive Domäne innerhalb des Transmembranproteins, deren Sequenz innerhalb von verschiedenen Retroviren als konserviert gilt. Ein Effekt der immunsuppressiven Domäne von Env ist die Inhibition von $CD8^+$ T-Zellantworten [30]. Dieser Effekt spielt nicht nur eine Rolle während der Infektion, sondern auch bei Vakzinierungen, die eine Immunantwort dieser Zellen induzieren sollen. Bei Adenovirus-basierten Ko-Immunisierungen von retroviralen Immunogenen stört Env die Induktion von $CD8^+$ T-Zell Antworten auf ein gleichzeitig geliefertes Immunogen [67]. Allerdings ist auch das Oberflächenprotein gp70 alleine in der Lage $CD8^+$ T-Zellantworten zu unterdrücken, der zugrundeliegende Mechanismus wurde noch nicht entschlüsselt. Im Friend-Virus Modell (FV) induziert die DNA-Immunisierung mit einem Plasmid, welches das F-MuLV Leader-Gag (LG) Protein kodiert, normalerweise starke Gag_{L85-93} -spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten.

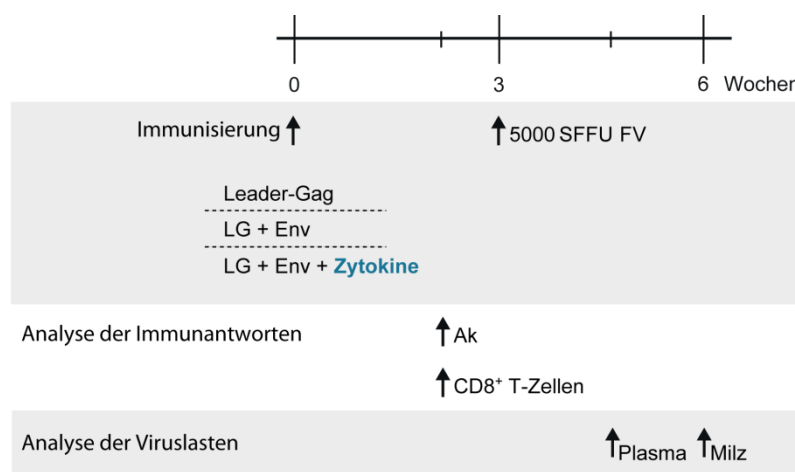


Abbildung 6: DNA-Immunisierungsschema.

Die DNA-Immunisierung erfolgte mit je 25 µg der angegebenen Plasmide intramuskulär in Kombination mit Elektroporation. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die Immunantworten analysiert und eine Woche danach erfolgte die Belastungsinfektion mit FV. Der Krankheitsverlauf wurde durch Palpation der Milzgrößen dokumentiert. Die Viruslasten wurden im Plasma und der Milz bestimmt.

Diese Immunantwort geht bei einer gleichzeitigen Immunisierung mit einem F-MuLV-Env kodierenden Plasmid verloren. Um diesen supprimierenden Effekt von Env zu überwinden wurden Zytokin-kodierende Plasmide als genetische Adjuvantien, zusätzlich zu den Immunogen kodierenden Plasmiden, verabreicht.

Die Zytokine IL1 β , IL12, IL15, IL18, IL21, IL28A und GM-CSF sind für ihre direkten oder indirekten Effekte auf das Priming und Überleben von CD8⁺ T-Zellen bekannt [33, 41, 65, 112]. Für die prophylaktische Immunisierung wurden susceptible CB6F1-Mäuse einmalig mit F-MuLV Leader-Gag kodierenden Plasmiden alleine oder in Kombination mit F-MuLV Env und Interleukin-kodierenden Plasmiden geimpft. Die Impfdosis betrug 25 μ g pro DNA-Plasmid in 30 μ l PBS und wurde intramuskulär (i.m.) in Kombination mit Elektroporation verabreicht. Drei Wochen nach der Vakzinierung wurden die Versuchstiere mit FV infiziert. Sowohl die verschiedenen Immunantworten, als auch die Viruslasten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 6).

4.1.2 Einfluss der Zytokin-Ko-Applikation auf die Gag-L₈₅₋₉₃-spezifischen T-Zellantworten

Die Frequenz der GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde 2 Wochen nach der Immunisierung durch MHC I-Tetramer-Färbung untersucht. Das Leader-Gag kodierende Plasmid alleine induziert starke GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe, wohingegen diese Antwort nicht mehr sichtbar war nach einer

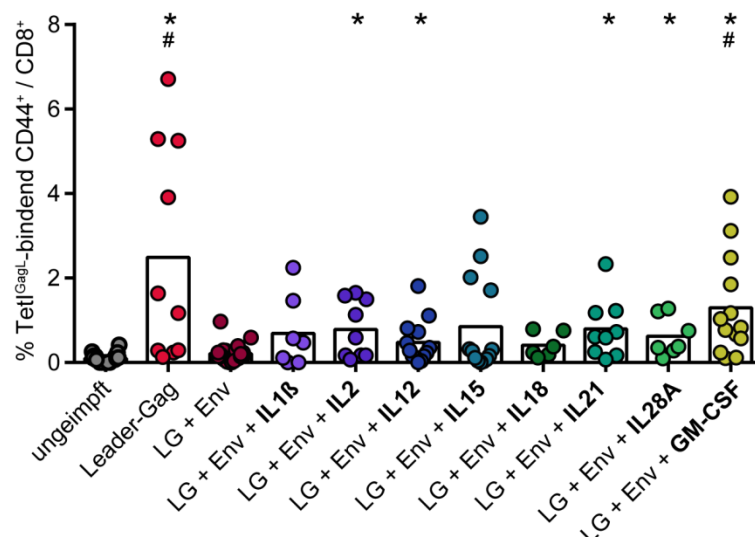


Abbildung 7: Induktion von GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

Susceptible CB6F1-Mäuse wurden mit Leader-Gag kodierenden Plasmiden, einem Mix aus LG + Env-kodierenden Plasmiden oder einem Mix aus LG + Env und Zytokin kodierenden Plasmiden geimpft. Von jedem Plasmid wurden 25 μ g intramuskulär injiziert und die Applikationsstelle anschließend elektroporiert. Zwei Wochen nach der Impfung wurde die Frequenz der GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert. * zeigt statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Tieren und # zeigt statistisch signifikante Unterschiede gegenüber LG + Env (P < 0,05). Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mittelwerte sind durch Balken dargestellt.

Ko-Immunisierung mit einem Env kodierenden Plasmid (LG + Env; Abbildung 7). Der supprimierende Effekt von Env auf die T-Zellantwort konnte durch die zusätzliche Injektion von IL2, IL12, IL21 und IL28A kodierenden Plasmiden moduliert werden. Im Vergleich zu der ungeimpften Kontrollgruppe lassen sich bei Ko-Immunisierungen mit diesen Zytokinen signifikante GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten induzieren. Der Mix aus LG + Env mit IL1 β , IL15 oder IL18 induzierte hingegen nur einen leichten Anstieg der GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten. Der stärkste Effekt auf die GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten wurde durch LG + Env mit GM-CSF erzielt. Die Vakzinierung induzierte signifikant höhere T-Zellantworten gegenüber der ungeimpften, als auch gegenüber der mit LG + Env geimpften Gruppe.

Neben den GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten wurde auch die Zytokin Produktion der induzierten CD8⁺ T-Zellen untersucht. Nur die Immunisierung mit Leader-Gag alleine induzierte eine signifikant höhere Frequenz von IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen gegenüber ungeimpften Mäusen. Die Frequenz dieser Zellen war außerdem bei einer Ko-Immunisierung mit LG + Env und GM-CSF tendenziell erhöht, der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant (Abbildung 8).

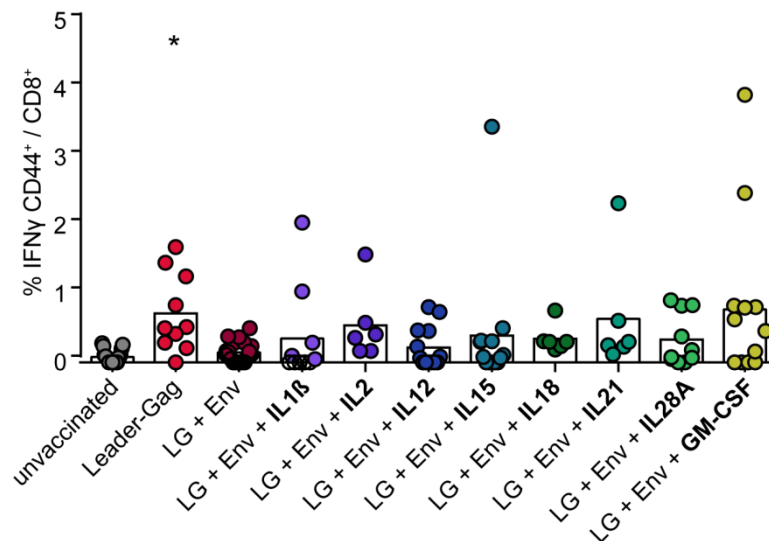


Abbildung 8: IFN γ -Produktion induzierter CD8⁺ T-Zellen.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden mit Leader-Gag kodierenden Plasmiden, einem Mix aus LG + Env-kodierenden Plasmiden oder einem Mix aus Leader-Gag, Env und Zytokin kodierenden Plasmiden geimpft. Von jedem Plasmid wurden 25 μ g intramuskulär injiziert und die Applikationsstelle anschließend elektroporiert. Zwei Wochen nach der Impfung wurde die IFN γ Produktion der induzierten CD8⁺ T-Zellen untersucht. * zeigt statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Tieren ($P < 0,05$). Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mittelwerte sind durch Balken dargestellt.

4.1.3 Einfluss der Zytokine auf die bindenden Antikörper

Die gewählten Zytokine könnten nicht nur einen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellen haben, sondern auch auf andere Immunantworten. Um den Einfluss auf humorale Immunantworten zu untersuchen, wurde das Level bindender Antikörper zwei Wochen nach der Immunisierung untersucht. Die Zytokine IL1 β , IL12, IL15, IL18, IL21 und IL28A beeinflussen die Bildung bindender Antikörper nicht (Abbildung 9). GM-CSF hat einen positiven Einfluss auf die Bildung bindender Antikörper, sowohl im Vergleich zu ungeimpften Tieren, als auch zu dem Mix aus LG + Env. Man geht heute davon aus, dass ein hochwirksamer Impfstoff gegen retrovirale Infektionen die Induktion von zellulären und humoralen Immunantworten erfordert, deshalb ist es wichtig, dass keines der Zytokine die Bildung von Antikörpern inhibiert. Im Fall von GM-CSF findet sogar eine Verbesserung der Antworten statt, was einen Schutz gegen die Infektion weiter verbessern kann.

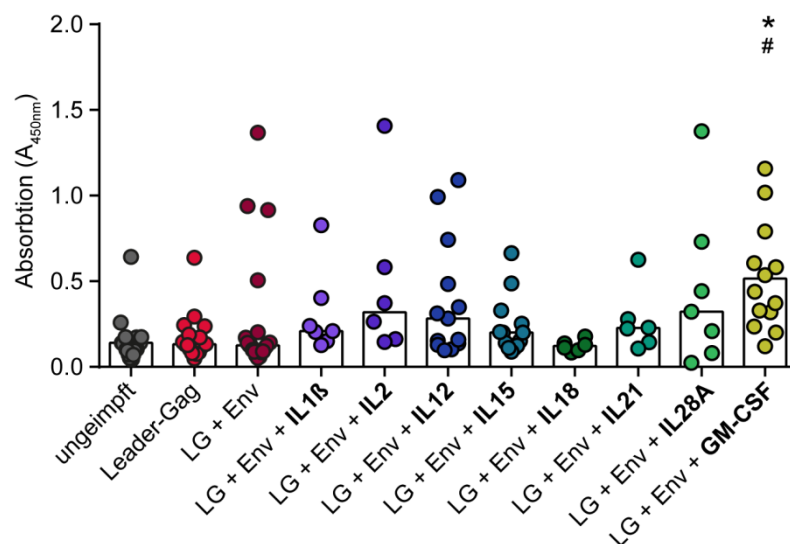


Abbildung 9: Bindende Antikörper nach DNA-Vakzinierung.

Susceptible CB6F1-Mäuse wurden mit Leader-Gag kodierenden Plasmiden, einem Mix aus LG + Env-kodierenden Plasmiden oder einem Mix aus Leader-Gag, Env und Zytokin kodierenden Plasmiden geimpft. Von jedem Plasmid wurden 25 μ g intramuskulär injiziert und die Applikationsstelle anschließend elektroporiert. Zwei Wochen nach der Impfung wurden die bindenden Antikörper untersucht. Die Abbildung zeigt Absorptionswerte für Plasmaproben, verdünnt 1:50 in PBS. Statistisch signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) verglichen mit nicht geimpften Mäusen sind mit * und verglichen mit LG + Env sind mit # gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mittelwerte sind durch Balken dargestellt.

4.1.4 Schutz vor FV-Infektion nach der Ko-Immunisierung mit Zytokinen

In suszeptiblen Mäusen induziert das FV eine Splenomegalie. Der Krankheitsverlauf wurde durch das Abtasten der Milzen zweimal wöchentlich nach der Infektion untersucht.

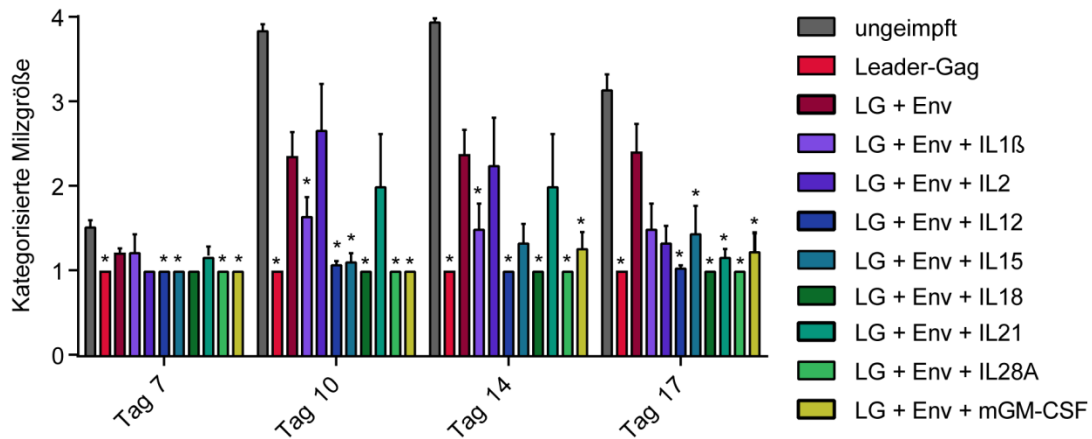


Abbildung 10: Milzgrößen nach Ko-Immunisierung mit Zytokinvektoren.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden einmal mit den angegebenen Vektoren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzgrößen wurden zweimal wöchentlich abgetastet und die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Mäusen sind mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$). Die Daten wurden in 2 bis 4 unabhängigen Experimenten erhoben mit jeweils 3 bis 4 Mäusen pro Gruppe und Experiment.

Die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Mäuse, die mit Leader-Gag alleine immunisiert wurden zeigten keine vergrößerten Milzen. Dagegen wiesen die mit LG + Env geimpften Mäuse ab Tag 10 stark vergrößerte Milzen auf. Mäuse, die mit LG + Env und IL12, IL15, IL28A oder GM-CSF appliziert wurden, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum kleine Milzen, die signifikant kleiner waren, als die Milzen der ungeimpften Mäuse (Abbildung 10). Den Tieren wurden drei Wochen nach der Belastungsinfektion die Milzen entnommen, gewogen und die Viruslasten bestimmt. Die Milzen aller ungeimpfter Tiere waren zu diesem Zeitpunkt vergrößert.

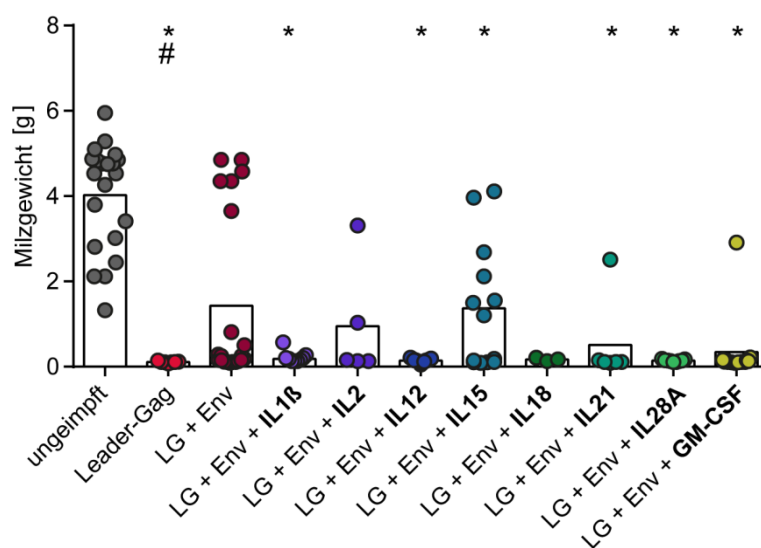


Abbildung 11: Milzgewichte nach Ko-Immunisierung mit Zytokinvektoren.

Drei Wochen nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die Milzgewichte ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * und gegenüber LG + Env mit # gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mittelwerte sind durch Balken dargestellt.

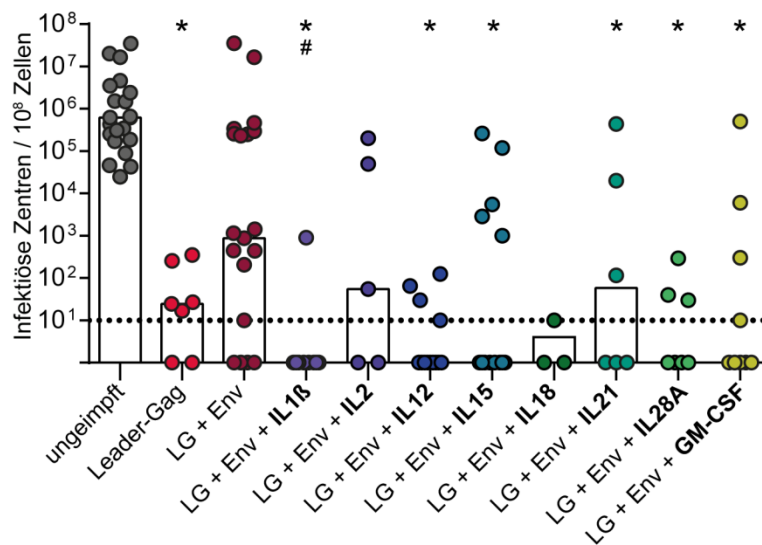


Abbildung 12: Viruslasten nach Ko-Immunisierung mit Zytokinvektoren.

Drei Wochen nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die Milzen entnommen und die Viruslasten bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet und gegenüber LG + Env mit #. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Median sind durch Balken dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt das Detektionslimit.

Die Immunisierung mit einem Leader-Gag kodierenden Plasmid alleine schützte die Mäuse vor Splenomegalie, sie wiesen kein erhöhtes Milzgewicht auf. Die Vakzinierung mit LG + Env induzierte in der Hälfte der Mäuse stark vergrößerte Milzen. Mäuse die mit Leader-Gag und Env kodierenden Plasmiden in Kombination mit den Zytokinen IL1 β , IL12, IL15, IL21, IL28A und GM-CSF immunisiert wurden konnten die Splenomegalie kontrollieren (Abbildung 11). Die Viruslasten in der Milz korrelierten mit den zuvor untersuchten Milzgewichten. Die nicht geimpften Mäuse wiesen alle sehr hohe Viruslasten in den Milzen auf. Nur zwei der mit LG + Env geimpften Mäuse zeigten Viruslasten unterhalb des Detektionslimits, aber die Mehrheit der Mäuse hatte sehr hohe Viruslasten ähnlich der ungeimpften Kontrollgruppe (Abbildung 12). Die Mäuse, die mit dem Leader-Gag kodierenden Plasmid alleine oder mit dem Mix aus LG + Env und IL1 β , IL12, IL15, IL21, IL28A oder GM-CSF geimpft wurden zeigten signifikant geringere Viruslasten, die meistens unterhalb des Detektionslimits lagen. Um sicherzustellen, dass die Zytokine alleine keinen Einfluss auf den Verlauf der FV-Infektion haben, wurden Mäuse zur Kontrolle nur mit den IL1 β , IL12, IL15, IL28A und GM-CSF kodierenden Plasmiden geimpft. Diese Zytokine wurden gewählt, da sie bei der Ko-Applikation mit den Immunogenen den stärksten Effekt auf die Viruslasten in den Milzen hatten. Die Mäuse wurden mit den Zytokin-Plasmiden geimpft und drei Wochen später erfolgte die Belastungsinfektion mit 5000 SFFU FV.

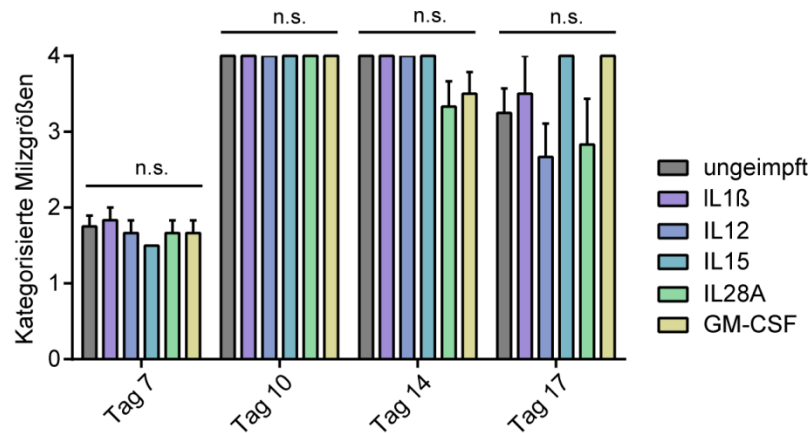


Abbildung 13: Milzgrößen nach der Immunisierung mit Zytokinvektoren.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden einmal mit den angegebenen Vektoren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzgrößen wurden zweimal wöchentlich abgetastet und die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Die Abkürzung n.s. steht für nicht signifikant. Die Daten wurden in einem Experiment erhoben mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe. Die Balken zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwerts an.

Der Krankheitsverlauf wurde durch das Abtasten der Milzen zweimal wöchentlich dokumentiert. Die Zytokin kodierenden Vektoren alleine reduzierten die Milzgrößen nicht (Abbildung 13). Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen entnommen, gewogen und die Viruslasten bestimmt. Das Gewicht der Milzen und die Viruslasten waren nicht signifikant verändert gegenüber der ungeimpften Kontrollgruppe.

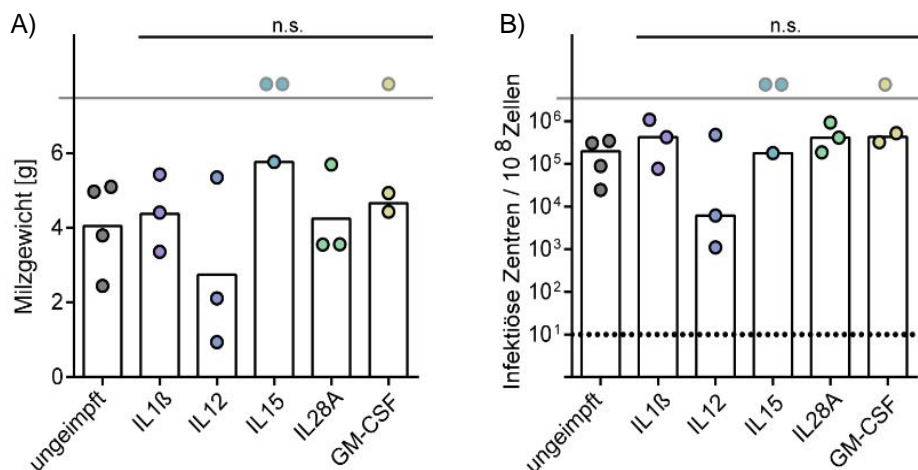


Abbildung 14: Milzgewichte und Viruslasten nach der Immunisierung mit Zytokinvektoren.

Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurde die Milzen entnommen, gewogen (A) und die Viruslasten bestimmt (B). Die Abkürzung n.s. steht für nicht signifikant. Die Daten wurden in einem Experiment erhoben mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mittelwerte (Milzgewicht) oder Mediane (Infektiöse Zentren) sind durch Balken dargestellt. Die grau umrandeten Punkte oberhalb der grauen Linie stehen für Mäuse, die auf Grund der Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen wurden. Die gestrichelte Linie zeigt das Detektionslimit.

Lediglich bei IL12 wurde eine Tendenz zur Reduktion der FV-Infektion unabhängig von der Impfung mit den Immunogenen beobachtet, allerdings waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant (Abbildung 14).

Zusammenfassend konnte durch die Ko-Immunisierung mit Zytokin kodierenden Vektoren der suppressierende Effekt von Env auf die Induktion von Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen moduliert werden. Dies zeigte sich nach der FV-Infektion in niedrigeren Milzgewichten, sowie in verringerten Viruslasten in der Milz. Bei der Untersuchung der zellulären Immunantwort induzierten vor allem die Zytokine IL2, IL12, IL21, IL28A und GM-CSF in Kombination mit LG + Env hohe spezifische CD8⁺ T-Zellantworten gegenüber ungeimpften Mäusen. GM-CSF modulierte die Bildung bindender Antikörper positiv, alle anderen Zytokine hatten keinen Einfluss auf die Bildung bindender Antikörper.

4.2 Prophylaktische MCMV-Immunisierung

Von den vielen Vektor-basierten Impfansätzen ist die Verwendung von CMV am vielversprechendsten. Zur Zeit wird ein Impfstoff auf der Basis von HCMV entwickelt, da die prophylaktische Vakzinierung von Rhesusaffen mit einem RhCMV/SIV Vektor-basierten Impfstoff den bisher besten Schutz der Affen gegen eine dem HIV verwandten SIV-Infektion (Simianes Immundefizienz-Virus, SIV) induzierte. In dieser Arbeit verwenden wir Impfstoffe auf der Basis von murinem Cytomegalievirus, das die Immunogene Env, Leader-Gag oder das modifizierte Leader-Gag_{C1K} von F-MuLV exprimiert, um das prophylaktische Potential im Friend-Virus-Modell zu untersuchen. Die prophylaktische Vakzinierung mit MCMV.env sollte potente CD4⁺ T-Zell- und Antikörperantworten induzieren [11], wohingegen eine Impfung mit MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{C1K} CD8⁺ T-Zellen induzieren sollte [45, 56].

4.2.1 Herstellung von rekombinantem MCMV

Die Herstellung von MCMV-basierten Impfvektoren erfolgte mit Hilfe der Bacmid-Technologie [82, 121]. Dabei wurde das gewünschte Transgen zunächst in die Expressionskassette des Vektors pFRTZ kloniert, hier wird die Expression des Transgens durch den CMV *major immediate early* Enhancer/Promotor angetrieben, das Plasmid enthält außerdem eine Flippase-Erkennungssequenz (FRT) und eine Zeocin-Resistenzkassette (Zeo^R). Das entstandene Insertionskonstrukt wurde dann in DH10B *E. coli* Bakterien transformiert, die ein rekombinantes MCMV Genom in Form von Bacmid-DNA enthalten (Abbildung 15). Das MCMV-Bacmid enthält eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (CAM^R) und auch eine

Flippase-Erkennungssequenz (FRT). Zusätzlich trägt das verwendete MCMV noch eine Deletion in *m157*. Das Gen kodiert ein Glycoprotein, welches normalerweise an den Ly49H Rezeptor der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bindet und diese dadurch aktiviert. An der ursprünglichen Position von *m157* in der Bacmid-DNA wird das Transgen eingefügt.

Tabelle 6: Herstellung von MCMV.Leader-Gag und MCMV-Leader-Gag_{CIK}

| Vektor | Herstellungsstrategie |
|--|---|
| MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag _{CIK} | PCR-Produkt aus den Oligonukleotiden Leader-Gag-HindIII und XhoI von pCG.Leader-Gag oder pCG.Leader-Gag _{CIK} in pFRTZ über HindIII und XhoI integriert; Rekombination in $\Delta m157$ MCMV-Bacmid-DNA; Southern-Blot Analyse; Transformation zur Rekonstitution in murine Fibroblasten |

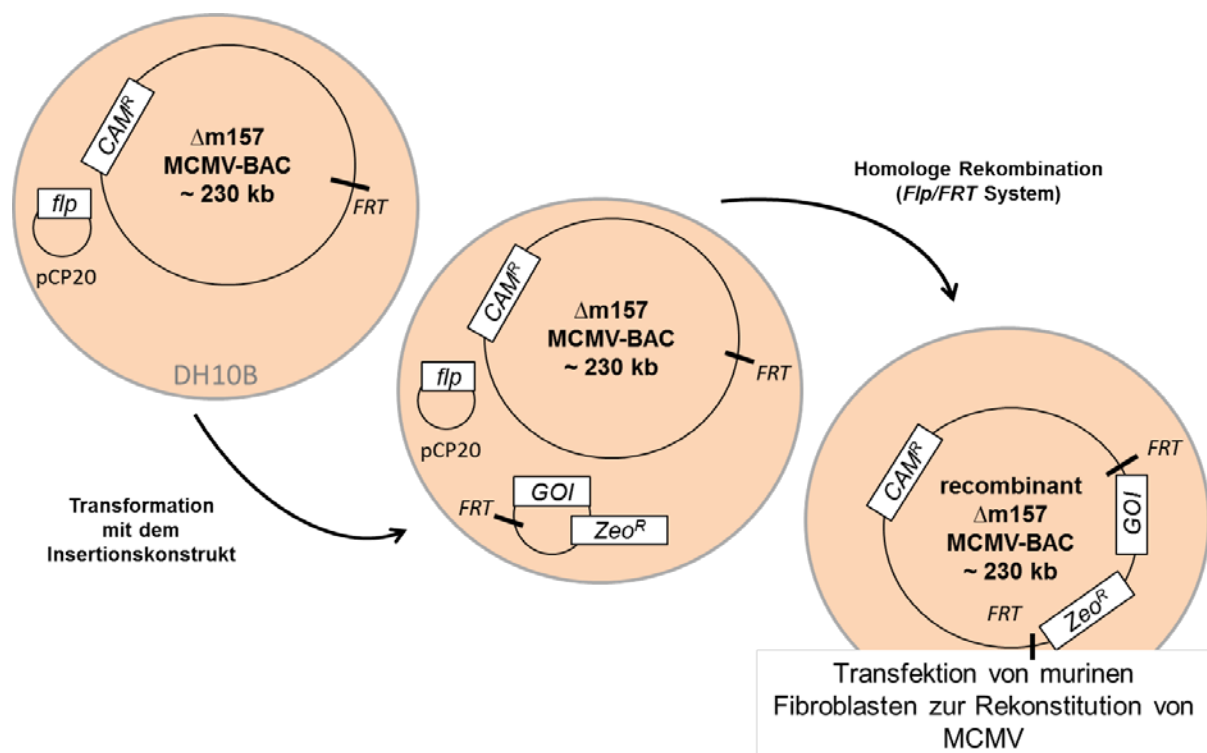


Abbildung 15: Insertion von heterologen Genen in das MCMV Genom mit Hilfe von Flp/FRT-vermittelter Rekombination in DH10B.

Das Insertionskonstrukt, welches Leader-Gag oder Leader-Gag_{CIK} als *gene of interest* (GOI) enthielt, wurde in $\Delta m157$ MCMV-Bacmid-DNA-haltige DH10B *E. coli* Bakterien transformiert. Mit Hilfe des Flp/FRT Systems wurde das Transgen in die Bacmid-DNA integriert und anschließend für die Rekonstitution des Virus in murine Fibroblasten transfiziert. Abkürzungen: CAM^R = Chloramphenicol-Resistenzkassette; *flp* = Flippase; FRT = Flippase-Erkennungssequenz; GOI = *gene of interest*; Zeo^R = Zeocin-Resistenzkassette

Durch die Verwendung von $\Delta m157$ wird sichergestellt, dass sich das replikationskompetente Virus *in vivo* weiter im Körper ausbreiten kann und die MCMV-infizierten Zellen nicht durch NK-Zellen erkannt und eliminiert werden. Die Deletion stellt daher auch sicher, dass das eingefügte Transgen effizient exprimiert wird [73].

Durch homologe Rekombination mit Hilfe des Flp/FRT-Systems in den transformierten DH10B *E.coli* Bakterien wurden die gewünschten Transgene in das MCMV-Bacmid integriert. Die Rekombinase Flippase (Flp) tauscht dabei DNA-Sequenzen ortsspezifisch aus, da sie an FRT-Sequenzen bindet und diese rekombiniert. Dadurch wurden die gewünschten Transgene Leader-Gag und Leader-Gag_{C1K} des FV in die Bacmid-DNA integriert. Das Leader-Gag Protein von F-MuLV enthält das einzig bekannte CD8⁺ T-Zellepitop Gag_{L85-93}. Bei dem modifizierten Leader-Gag Protein Leader-Gag_{C1K} wurde das Tyrosin an der das Epitop C-terminal flankierenden Position C + 1 durch ein Lysin ersetzt, wodurch der proteasomale Abbau und die Präsentation via MHC I verbessert wurde. Diese Modifikation induzierte bei Impfungen mit adenoviralem Hintergrund eine Gag_{L85-93}-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort, im Gegensatz zu Leader-Gag in seiner nativen Sequenz [45].

Die Kontrolle der Insertion der beiden Transgene erfolgte mit Southern-Blot-Analysen. Zur Herstellung der Viren wurde die rekombinante Bacmid-DNA in murine Fibroblasten transformiert, um die MCMV Viren herzustellen und zu isolieren.

4.2.2 Analyse von Immunantworten nach der Impfung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K}

Um die Effizienz der neu hergestellten Vektoren MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K} als Impfvektoren zu untersuchen, wurden CB6F1-Mäuse mit 2×10^5 pfu immunisiert, als Kontrollvektor diente MCMV.parental, welches kein Transgen kodiert. Die Frequenz der Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde 2 Wochen nach Immunisierung durch MHC I-Tetramer-Färbung untersucht (Zeitlicher Ablauf s. Abbildung 16). MCMV.parental induzierte keine Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, da dieses Virus keine FV Epitope exprimiert. Allerdings induzierten auch die Vektoren MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K} zu diesem Zeitpunkt keine Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu ungeimpften Mäusen (Abbildung 17 A).

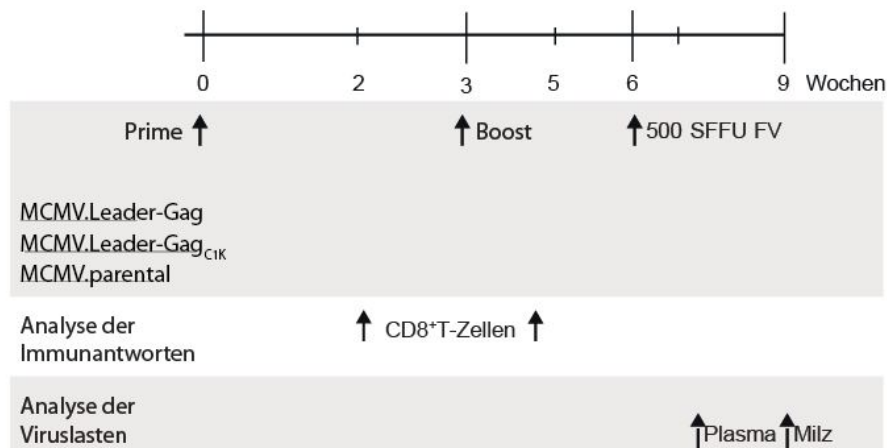


Abbildung 16: MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{CIK} Immunisierungsschema.

Die erste Immunisierung (Prime) mit den angegebenen MCMV Vektoren erfolgte mit 2×10^5 oder 1×10^6 pfu / Maus in 300 μ l PBS intraperitoneal. Zwei Wochen nach der prophylaktischen Impfung wurden die Immunantworten untersucht und eine Woche später wurde mit 1×10^6 pfu / Maus in 300 μ l PBS intraperitoneal ein zweites Mal geimpft (Boost). Zwei Wochen später wurden die Immunantworten nochmal untersucht. Eine Woche später erfolgte die Belastungsinfektion mit 500 SFFU FV intravenös. Die Milzgrößen wurden zweimal wöchentlich ertastet und die Viruslasten wurden im Blut und in der Milz untersucht.

Um die Immunantworten zu verstärken wurde ein zweites Mal mit 1×10^6 pfu pro Maus in 300 μ l PBS intraperitoneal geimpft. Die erhöhte Dosis der Viren induzierte ebenfalls keine GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten nach der Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{CIK} (Abbildung 17 B) im Vergleich zu ungeimpften Mäusen und der parentalen Kontrollgruppe.

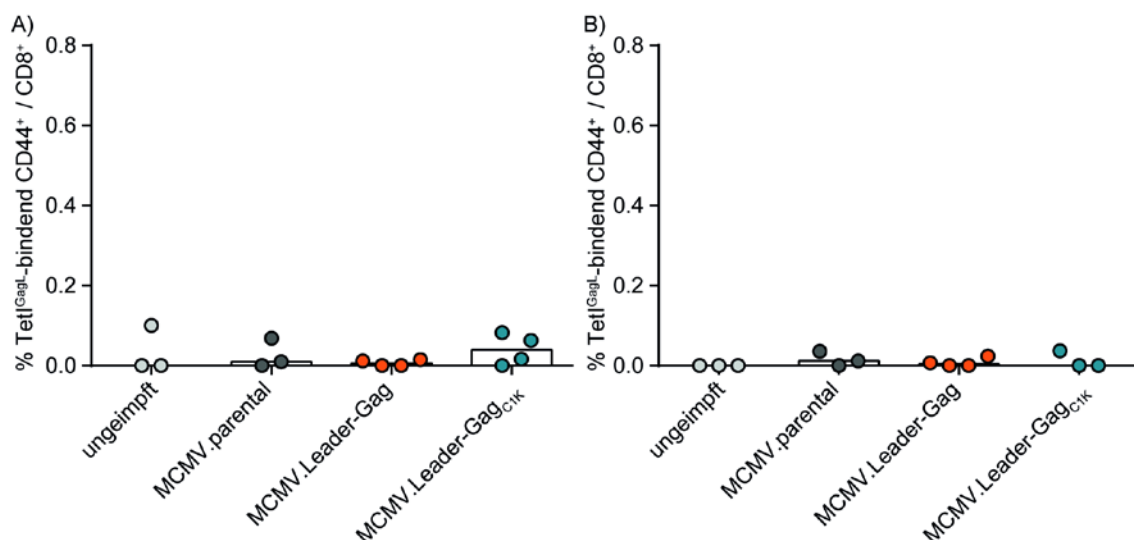


Abbildung 17: Induktion von GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach der ersten und zweiten Immunisierung.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden mit MCMV.parental als Kontrolle, MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{CIK} geimpft. Von jedem Virus wurden 2×10^5 pfu bei der ersten (Prime) und 1×10^6 pfu pro Maus in 300 μ l PBS intraperitoneal bei der zweiten Immunisierung (Boost) geimpft. Je zwei Wochen nach der ersten (A) und der zweiten Immunisierung (B) wurden die GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺-Zellantworten analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

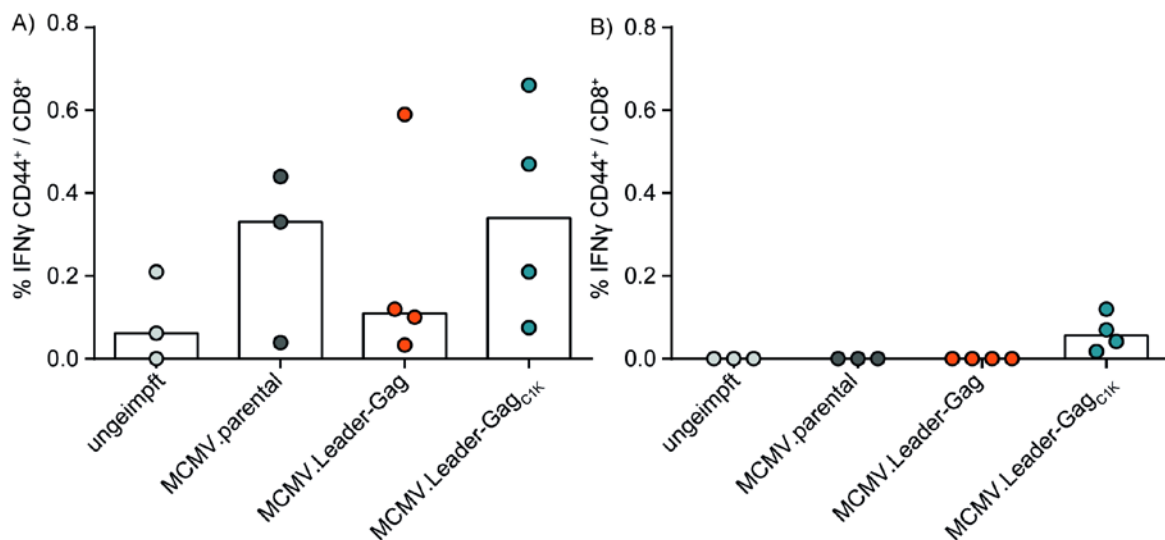


Abbildung 18: Induktion von IFN γ in GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden mit MCMV.parental als Kontrolle, MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{C1K} geimpft. Von jedem Virus wurden 2 x 10⁵ pfu bei der ersten (Prime) und 1 x 10⁶ pfu pro Maus in 300 μ l PBS intraperitoneal bei der zweiten Immunisierung (Boost) geimpft. Je zwei Wochen nach der ersten (A) und der zweiten Immunisierung (B) wurde die IFN γ -Produktion der GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Die GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort wurde auch durch Analyse der IFN γ Produktion nach Peptidstimulation untersucht. Die erste Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K} induzierte keine erhöhte Frequenz von IFN γ in den CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum parentalen MCMV oder der ungeimpften Kontrollgruppe (Abbildung 18 A). Nach der zweiten Immunisierung ist ebenfalls keine IFN γ -Produktion der mit MCMV.parental oder MCMV.Leader-Gag geimpften Mäuse messbar. MCMV.Leader-Gag_{C1K} induzierte einen sehr leichten Anstieg von IFN γ im Vergleich zur ungeimpften Gruppe und der Gruppe, die mit dem parentalen Virus geimpft wurde (Abbildung 18 B). Die Vakzinierung der CB6F1-Mäuse mit MCMV.parental, MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K} induzierte keine GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten. Wahrscheinlich sind die CD8⁺ T-Zellantworten eher gegen das MCMV, als gegen das FV Epitop gerichtet. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden die isolierten Blutzellen jeweils nach der ersten und der zweiten Immunisierung mit MHC I-Peptiden aus MCMV Proteinen stimuliert und die Zytokinproduktion analysiert [88]. Alle Immunisierungen mit MCMV.parental, MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{C1K} induzierten eine tendenziell höhere Frequenz von IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu der ungeimpften Kontrollgruppe (Abbildung 19).

Die Frequenz der IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen entspricht sowohl nach der ersten (Abbildung 19 A), als auch nach der zweiten Immunisierung (Abbildung 19 B) mit MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{C1K} der Induktion durch MCMV.parental. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar.

In den meisten Mäusen konnte nur eine CD8⁺ T-Zellantwort gegen MCMV nachgewiesen werden; möglicherweise wird auf Grund von Immundominanz keine Gag_{L85-93}-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort ausgebildet.

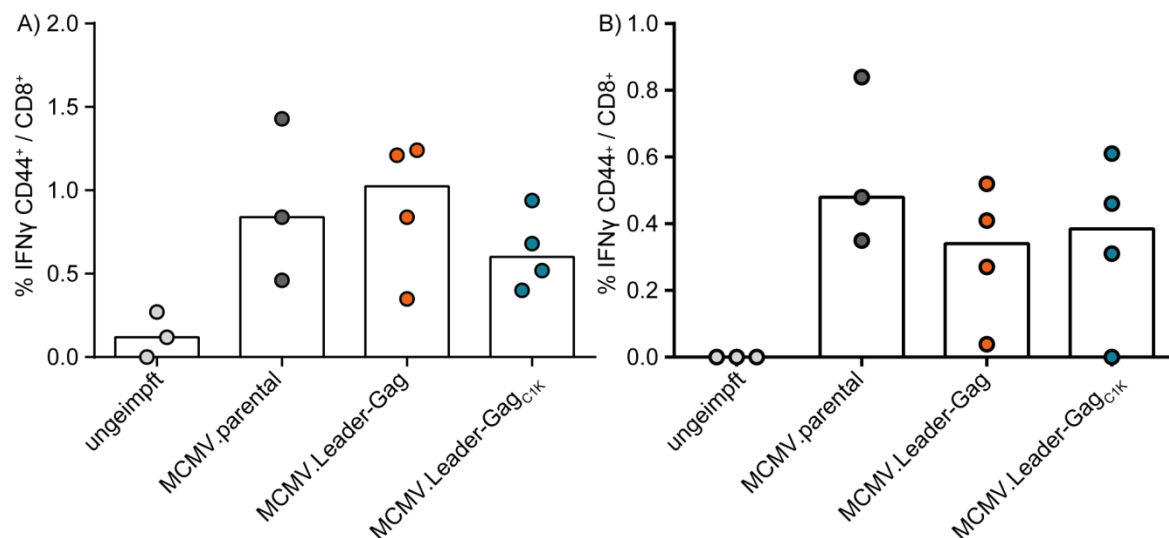


Abbildung 19: Induktion von IFN γ nach der Stimulation mit MCMV-Peptiden.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden mit MCMV.parental als Kontrolle, MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{C1K} geimpft. Von jedem Virus wurden 2×10^5 pfu bei der ersten (Prime) und 1×10^6 pfu pro Maus in 300 μ l PBS intraperitoneal bei der zweiten Immunisierung (Boost) geimpft. Je zwei Wochen nach der ersten (A) und der zweiten Immunisierung (B) wurde die IFN γ -Produktion der MCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

4.2.3 Schutz vor FV-Infektion nach der Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K}

Da keine Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten induziert wurden erfolgte die Belastungsinfektion der hoch suszeptiblen CB6F1-Mäuse nur mit einer niedrigen Dosis von 500 SFFU FV. Der Krankheitsverlauf der FV-Infektion wurde zweimal wöchentlich durch das Abtasten der Milzen dokumentiert. An Tag 10 nach der Belastungsinfektion waren die Milzen der ungeimpften Tiere bereits stark vergrößert (Abbildung 20). Auch die mit MCMV.parental und MCMV.Leader-Gag_{C1K} geimpften Tiere wiesen schon vergrößerte Milzen auf. Lediglich die Milzen der mit MCMV.Leader-Gag geimpften Tiere wiesen noch keine stark vergrößerten Milzen zu diesem Zeitpunkt auf.

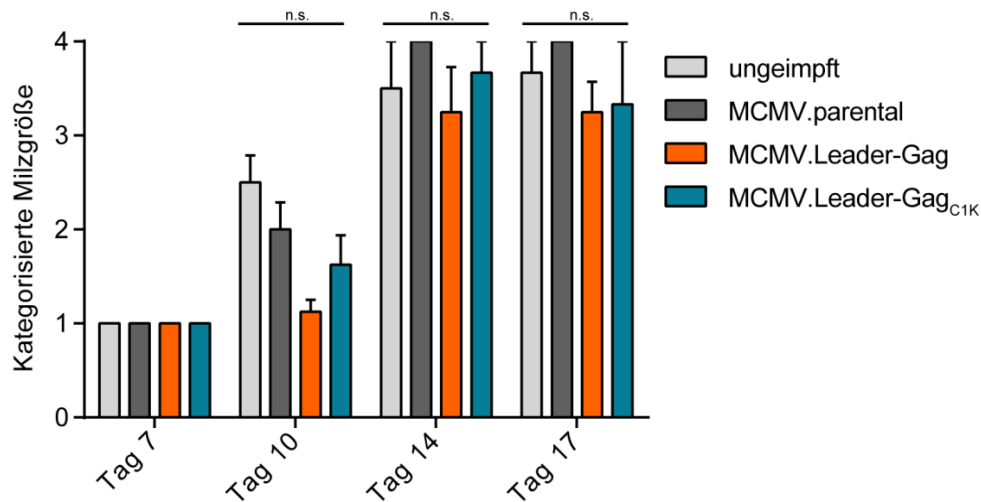


Abbildung 20: Kategorisierte Milzgrößen nach der Prime/Boost-Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leadergag_{C1K}.

Der Krankheitsverlauf nach der Belastungsinfektion mit 500 SFFU FV wurde durch das Abtasten der Milzgrößen zweimal wöchentlich dokumentiert. Die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Die Daten wurden in einem Experiment erhoben mit jeweils 3-4 Mäusen pro Gruppe. Die Abkürzung n.s. steht für nicht signifikant. Die Balken zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwerts an.

An Tag 14 der Infektion waren jedoch die Milzen aller Mäuse stark vergrößert, und die durch FV induzierte Vergrößerung der Milzen blieb auch an Tag 17 nach der Infektion in allen Gruppen erhalten. Drei Wochen nach der FV-Infektion wurden die Milzen entnommen, gewogen und die Viruslast bestimmt. Alle Gruppen zeigten zu diesem Zeitpunkt hohe Milzgewichte (Abbildung 21 A).

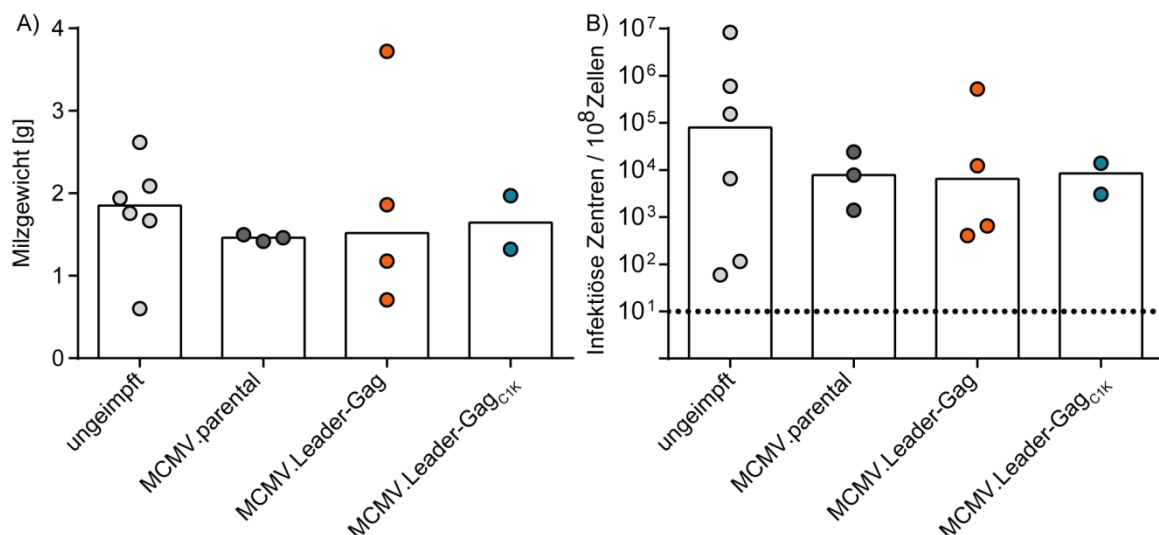


Abbildung 21: Milzgewichte und Viruslasten nach der Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K}.

Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Milzen entnommen, gewogen (A) und die Viruslasten bestimmt (B). Die Daten wurden in einem Experiment erhoben mit jeweils 2-4 Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Die Viruslasten korrelieren mit den hohen Milzgewichten, die sowohl nach der Impfung mit dem parentalen Virus, als auch mit MCMV-Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{CIK} gegenüber der ungeimpften Gruppe nicht signifikant verringert waren (Abbildung 21 B).

Drei Wochen nach der FV-Infektion wurden die Milzen entnommen, gewogen und die Viruslast bestimmt. Alle Gruppen zeigten zu diesem Zeitpunkt hohe Milzgewichte (Abbildung 21 A). Die Viruslasten korrelieren mit den hohen Milzgewichten, die sowohl nach der Impfung mit dem parentalen Virus, als auch mit MCMV-Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{CIK} gegenüber der ungeimpften Gruppe nicht signifikant verringert waren (Abbildung 21 B). Die Impfung schützte die Mäuse nicht vor der durch FV induzierten Splenomegalie.

4.2.4 Analyse der Immunantworten nach der Immunisierung mit MCMV.env

Um einen guten Schutz gegen die FV-Infektion zu erhalten ist eine komplexe Immunantwort notwendig, an der sowohl CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, als auch Antikörper beteiligt sind [36]. Die homologe Prime/Boost-Vakzinierung mit MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{CIK} konnte keine Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten und keinen Schutz vor der FV-Infektion induzieren. Um zu untersuchen, ob die Induktion von Env-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und Antikörpern im MCMV-Hintergrund ausreicht, um einen Schutz vor der FV-Infektion zu induzieren, wurde mit MCMV.env geimpft.

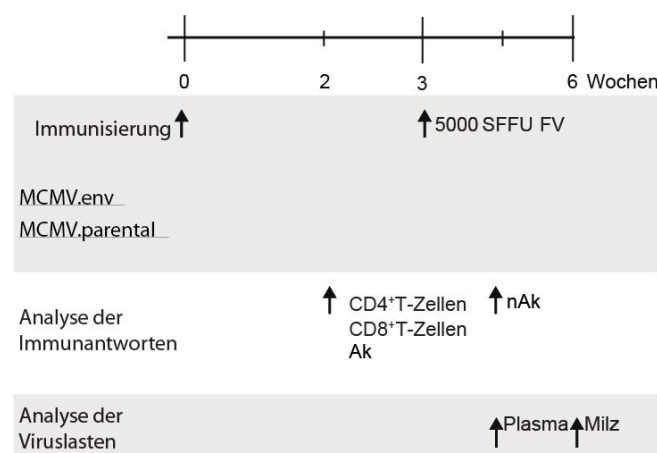


Abbildung 22: Schema der einmaligen Impfung mit MCMV.env.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env oder MCMV.parental als Kontrollvektor intraperitoneal einmal geimpft. Zwei Wochen nach der Impfung wurden die Immunantworten im Blut untersucht. Drei Wochen nach der Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion mit FV. Der Krankheitsverlauf wurde durch Palpation der Milzgrößen dokumentiert. Die Viruslasten wurden im Plasma und der Milz bestimmt.

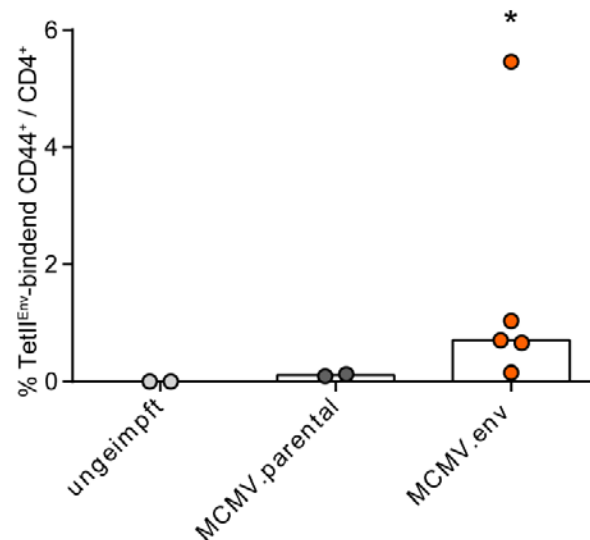


Abbildung 23: Env-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten nach einmaliger Immunisierung.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env oder MCMV.parental als Kontrollvektor intraperitoneal einmal geimpft. Zwei Wochen nach der Impfung wurden die CD4⁺ T-Zellantworten durch MHC II-Tetramer Färbung im Blut untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$). Die Daten wurden in einem Experiment mit jeweils 2-5 Mäusen pro Gruppe erhoben. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Mäuse wurden durch die intraperitoneale Dosis von 2×10^5 pfu pro Maus in 300 μ l PBS geimpft. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die Immunantworten im Blut untersucht (Schematische Abbildung des Versuchsablaufs s. Abbildung 22).

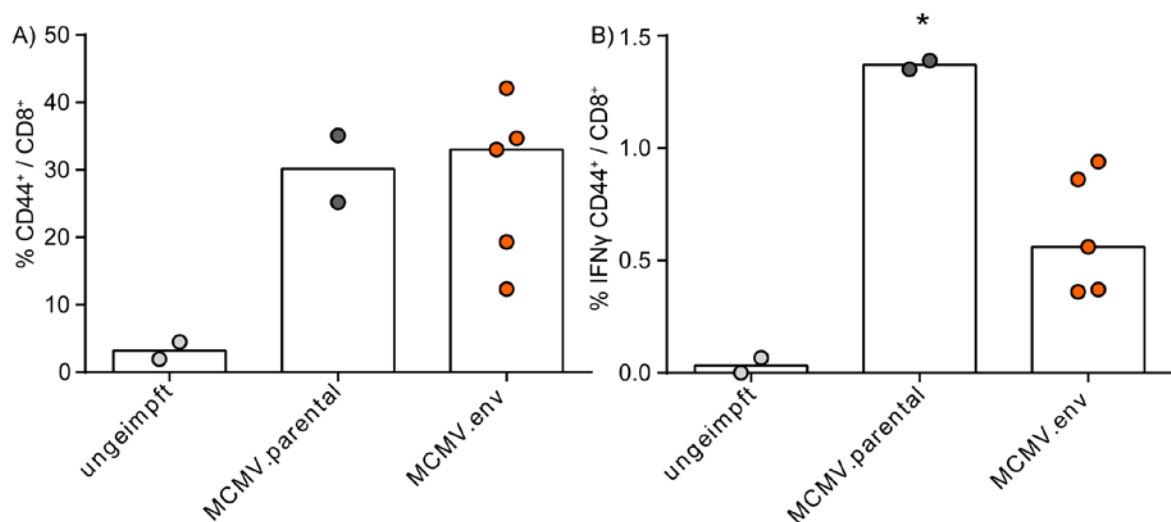


Abbildung 24: MCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env oder MCMV.parental intraperitoneal einmal geimpft. Zwei Wochen nach der Impfung wurde der Anteil der aktivierten CD8⁺ T-Zellen (A) und die Frequenz von IFN γ der CD8⁺ T-Zellen im Blut untersucht (B). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$). Die Daten wurden in einem Experiment mit jeweils 2-5 Mäusen pro Gruppe erhoben. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Drei Wochen nach der Immunisierung mit MCMV.env erfolgte die intravenöse Belastungsinfektion mit 5000 SFFU FV. Der Krankheitsverlauf wurde durch das Abtasten der Milzgrößen zweimal wöchentlich dokumentiert. Die Viruslasten wurden nach der Infektion im Plasma und der Milz bestimmt.

Zwei Wochen nach der Impfung wurden die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen Immunantworten mit Hilfe von MHC II-Tetramer im Blut untersucht. Das parentale MCMV induzierte keine Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort, da es kein Immunogen von F-MuLV exprimiert. Die Impfung mit MCMV.env induzierte sehr starke Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten von bis zu 5 %. Diese Induktion war statistisch signifikant gegenüber der ungeimpften Gruppe (Abbildung 23).

Neben den Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen Immunantworten wurden wie zuvor die Immunantworten der CD8⁺ T-Zellen gegen MCMV durch Bestimmung der Zytokin-Produktion nach Peptid-Stimulation analysiert. Nach der Immunisierung mit MCMV.parental und MCMV.env wurden tendenziell gleich viele aktivierte CD8⁺ T-Zellen induziert (Abbildung 24 A). Die CD8⁺ T-Zellen der mit MCMV.parental geimpften Mäuse zeigten eine statistisch signifikant höhere Frequenz an IFN γ im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe (Abbildung 24 B). Die mit MCMV.env geimpften Mäuse zeigten eine niedrigere Frequenz von IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen, als die mit MCMV.parental geimpften Mäuse.

Neben den zellulären Immunantworten wurde auch die humorale Immunantwort analysiert.

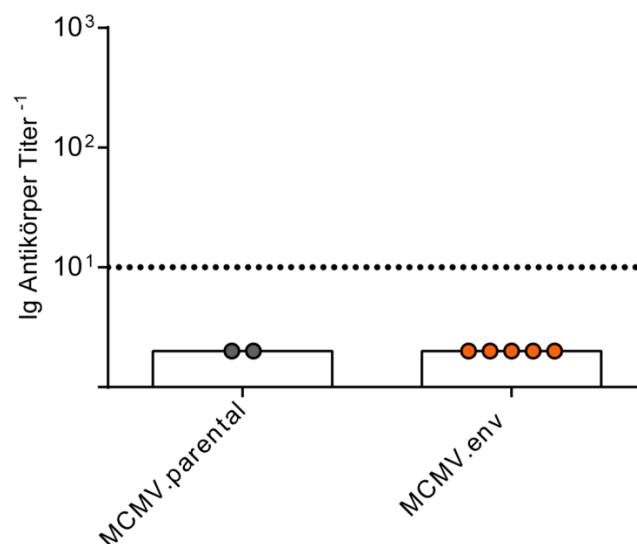


Abbildung 25: Antikörpertiter nach einmaliger Immunisierung mit MCMV.env.

Zwei Wochen nach der Immunisierung der CB6F1-Mäuse mit den angegebenen Viren wurde der Titer der bindenden Antikörper im Blut untersucht. Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus und Mediane sind durch Balken gekennzeichnet. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

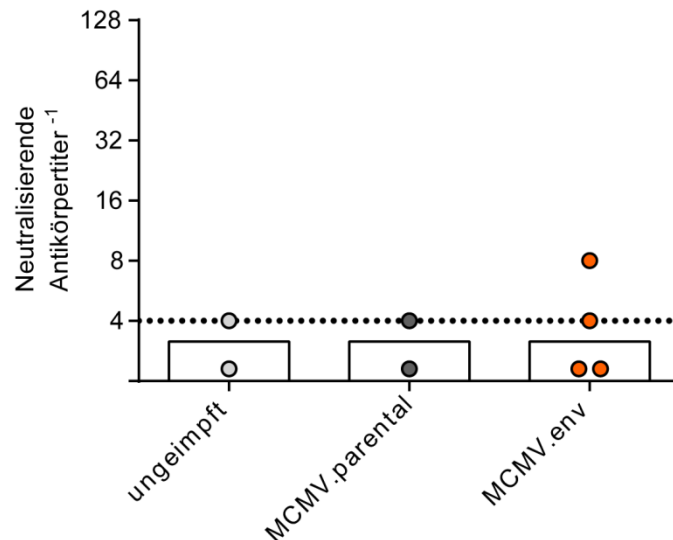


Abbildung 26: Neutralisierende Antikörpertiter an Tag 10 nach der FV Belastungsinfektion. Zehn Tage nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die neutralisierenden Antikörper im Plasma untersucht. Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus und Mediane sind durch Balken gekennzeichnet. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die bindenden Antikörpertiter der mit MCMV.parental und MCMV.env geimpften Tiere mit Hilfe von ELISA analysiert. Nach der Immunisierung mit MCMV.parental wurden keine bindenden Antikörper induziert. Auch in den mit MCMV.env immunisierten Mäusen konnten keine bindenden Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 25).

An Tag 10 nach der Belastungsinfektion mit FV wurden neutralisierende Antikörperantworten untersucht. In der ungeimpften und mit parentalem Virus geimpften Kontrollgruppe wurden jeweils nur in einer Maus neutralisierende Antikörper induziert. MCMV.env induzierte nur in zwei Mäusen detektierbare neutralisierende Antikörper. (Abbildung 26).

4.2.5 Schutz vor der FV-Infektion nach Immunisierung mit MCMV.env

Um den durch die Immunisierung vermittelten Schutz zu analysieren wurden die Mäuse mit einer hohen Dosis von 5000 SFFU FV infiziert und der Krankheitsverlauf durch das Erasten der Milzgrößen dokumentiert (Abbildung 27). An Tag 7 der FV-Infektion waren die Milzen der ungeimpften Mäuse bereits stark vergrößert, wohingegen die Milzen der mit MCMV.parental und MCMV.env geimpften Mäuse normal groß waren. Ab Tag 10 nahmen auch die Milzgrößen dieser Gruppen stark zu und zeigten Milzgrößen ähnlich der ungeimpften Gruppe. Die Milzen aller Mäuse blieben stark vergrößert über den gesamten Beobachtungszeitraum.

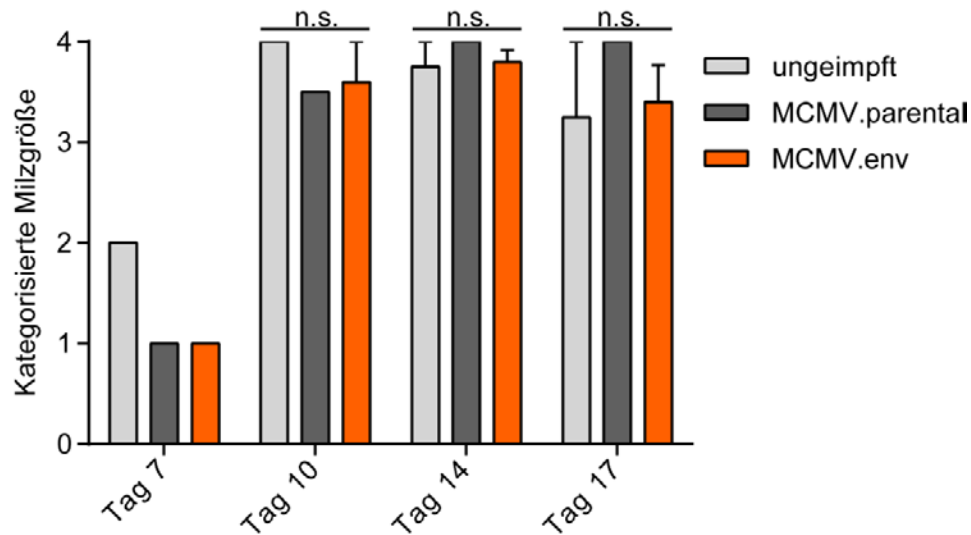


Abbildung 27: Kategorisierte Milzgrößen nach der Immunisierung mit MCMV.env. Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden einmal mit den angegebenen Viren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzgrößen wurden zweimal wöchentlich ertastet und die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Die Daten wurden in einem Experiment erhoben mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe. Die Abkürzung n.s. steht für nicht signifikant. Die Balken zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwerts an.

Drei Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die Milzen entnommen und gewogen (Abbildung 28). Die Milzgewichte der zwei ungeimpften Mäuse schwankten sehr stark, lagen aber beide deutlich oberhalb der Milzgewichte von gesunden Mäusen. Die Milzen der mit MCMV.parental geimpften Mäuse liegen alle oberhalb von 4 g. Auch die Milzen der mit MCMV.env geimpften Mäuse sind alle vergrößert.

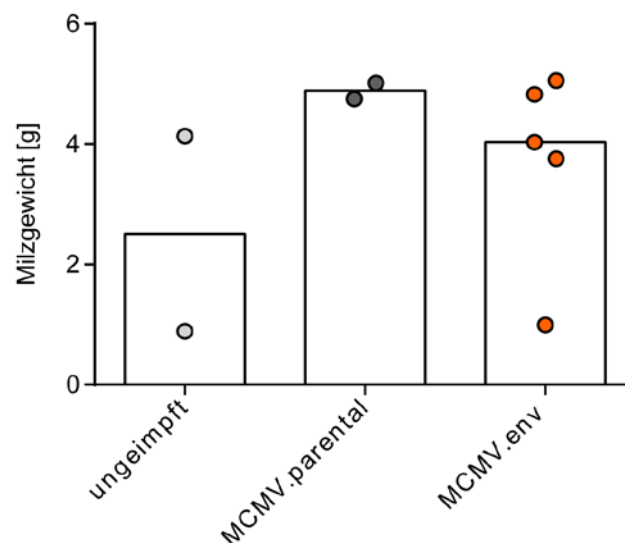


Abbildung 28: Milzgewichte nach der Immunisierung mit MCMV.env. Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden einmal mit den angegebenen Viren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzen wurden drei Wochen nach der Infektion entnommen und gewogen. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Die Viruslasten wurden an Tag 10 im Plasma und drei Wochen nach der Infektion mit FV in der Milz analysiert (Abbildung 29 A). Die Viruslasten korrelierten mit den gemessenen Milzgrößen. Bereits an Tag 10 der FV-Infektion war im Plasma kein Unterschied zwischen den drei Gruppen in Bezug auf freies Virus erkennbar. Die MCMV.parental und MCMV.env geimpften Mäuse wiesen auch drei Wochen nach der Infektion Viruslasten vergleichbar mit denen der ungeimpften Mäuse auf (Abbildung 29 B).

Die einmalige Vakzinierung mit MCMV.env induzierte also keinen Schutz der Mäuse vor der FV-Infektion, obwohl die Immunisierung starke Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten hervorrief.

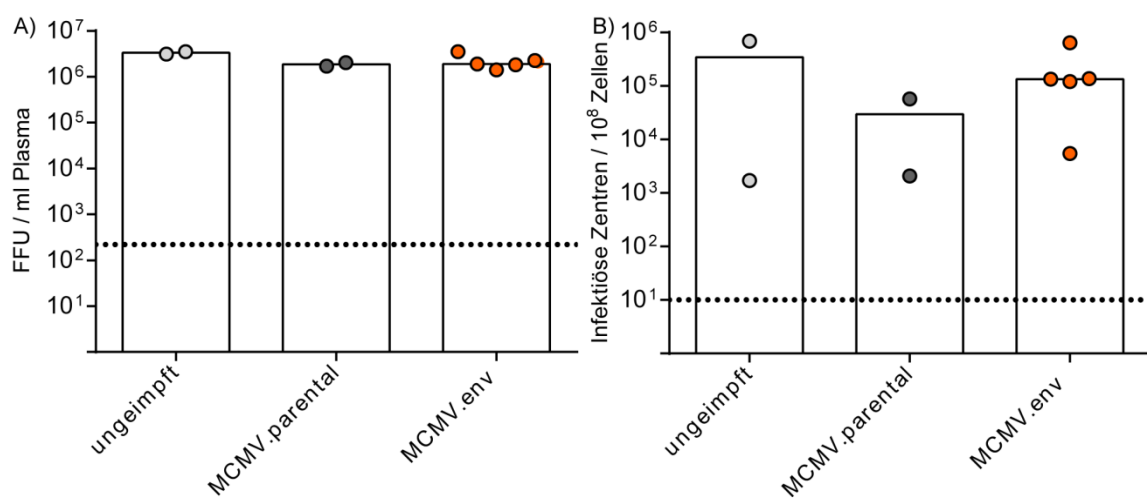


Abbildung 29: Viruslasten im Plasma und in den Milzen MCMV.env-vakzinierter Mäuse.

Freies Virus im Plasma wurde 10 Tage nach Infektion analysiert (A). Zur Bestimmung der Viruslast in den Milzen wurden virusinfizierte Zellen 21 Tage nach Infektion untersucht (B). Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus. Die Daten entstanden in einem Experiment mit 2-5 Mäusen pro Gruppe, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

4.2.6 Analyse der Immunantworten nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env

Die einmalige Immunisierung induzierte keinen Schutz gegen die FV-Infektion, daher wurde eine zweite Immunisierungsstrategie verfolgt. Es ist bekannt, dass die wiederholte Verabreichung von Impfstoffen eine verbesserte Effizienz gegenüber einmaligen Vakzinierungen zeigen kann.

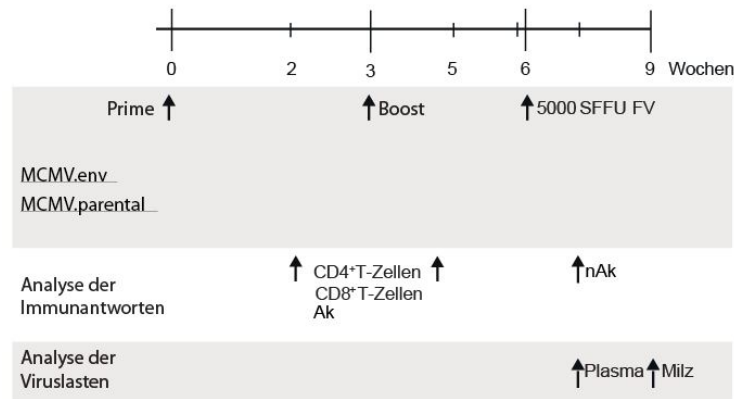


Abbildung 30: Immunisierungsschema II mit MCMV.env.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env oder MCMV.parental intraperitoneal einmal oder im Abstand von drei Wochen zweimal geimpft. Je zwei Wochen nach der Impfung wurden die Immunantworten im Blut untersucht. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Belastungsinjektion mit 5000 SFFU FV intravenös. Der Krankheitsverlauf wurde durch Palpation der Milzgrößen dokumentiert. Neutralisierende Antikörper wurden an Tag 10 nach der Infektion analysiert. Die Viruslasten wurden im Plasma und der Milz bestimmt.

Bei der zweiten Immunisierungsstrategie wurde daher eine homologe Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env im Abstand von drei Wochen mit 2×10^5 pfu pro Maus in 300 μ l PBS durchgeführt. Zusätzlich gab es eine zweite Gruppe, die nur einmal mit MCMV.env geimpft wurde und zur gleichen Zeit, wie die zweimal geimpften Mäuse, mit FV infiziert wurde.

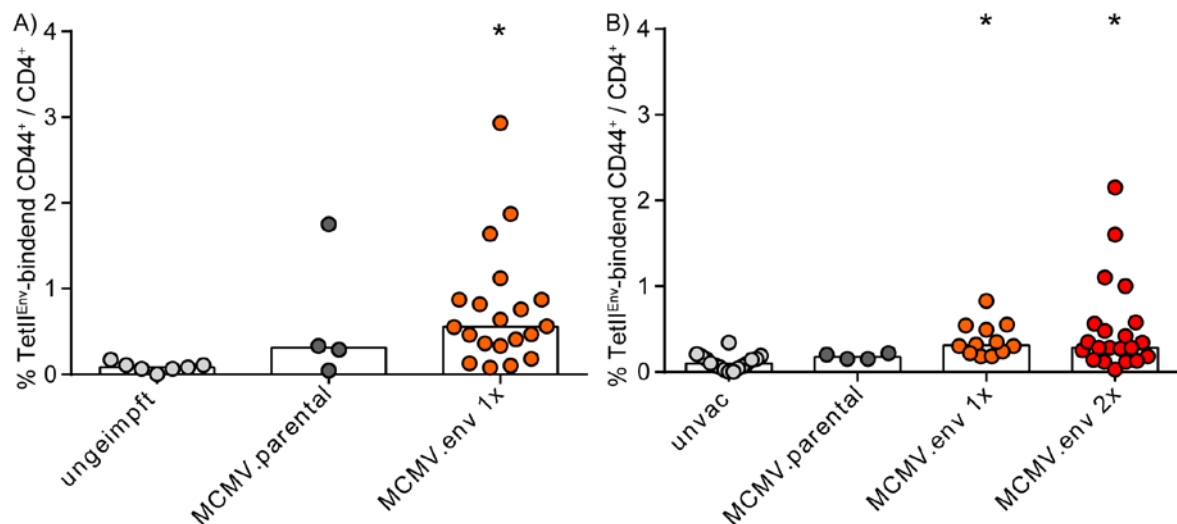


Abbildung 31: Env-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env. Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env oder MCMV.parental intraperitoneal einmal oder im Abstand von drei Wochen zweimal geimpft. Zwei Wochen nach der ersten Immunisierung (A) und nach der zweiten Immunisierung (B) wurden die Immunantworten mit MHC-II-Tetramer-Färbung von Blutzellen untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$). Die Daten wurden in vier unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe erhoben. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Dadurch wurde auch das Zeitintervall zwischen der einmaligen Immunisierung und der Belastungsinfektion mit FV erhöht, was zu einer längeren Exposition des Immunsystems mit dem Immunogen führt. Das homologe Prime-Boost-Schema ist in Abbildung 30 gezeigt. Je zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten, die CD8⁺ T-Zellantworten gegen fünf MCMV-spezifische MHC-I Peptide und bindende Antikörper untersucht.

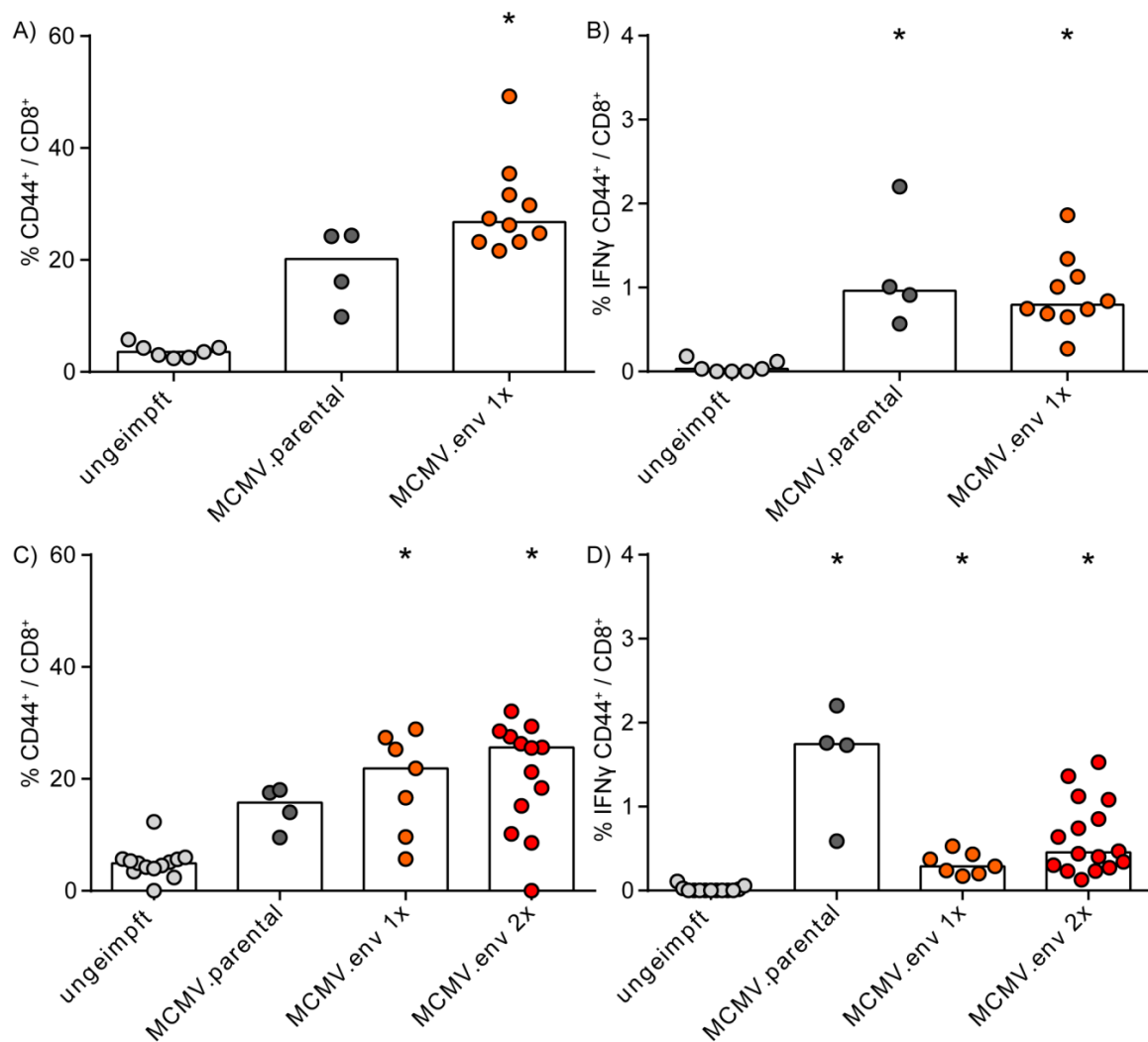


Abbildung 32: Einfluss der MCMV.env Prime-Boost-Applikation auf die MCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env oder MCMV.parental ein- oder zweimal geimpft. Jeweils zwei Wochen nach der Impfung wurden der Anteil der aktivierten CD8⁺ T-Zellen (A, C) und die Immunantworten der Zellen im Blut untersucht (B, D). A und B zeigen die Immunantworten nach der ersten und C und D nach der zweiten Immunisierung mit MCMV.env. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet (P < 0,05). Die Daten wurden in drei Experimenten mit jeweils 2-5 Mäusen pro Gruppe erhoben. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Die Infektion mit 5000 SFFU FV erfolgte drei Wochen nach der zweiten Immunisierung mit MCMV.env. Der Verlauf der FV-Infektion wurde durch das Ertasten der Milzgrößen zweimal wöchentlich untersucht. An Tag 10 nach der Infektion wurden die neutralisierenden Antikörper und das freie Virus im Blut analysiert. Drei Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die Milzen entnommen, gewogen und die Viruslasten bestimmt.

Die einmalige Immunisierung mit 2×10^5 pfu MCMV.env induzierte schon im ersten Versuch sehr starke Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten, daher wurde das Zeitintervall von zwei Wochen zwischen der Immunisierung und der Untersuchung der CD4⁺ T-Zellantworten im Blut beibehalten. Nach der ersten Immunisierung mit MCMV.env wurden wie zuvor gezeigt statistisch signifikante Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten gegenüber der ungeimpften Gruppe induziert (Abbildung 31 A). Die Immunisierung mit dem parentalen Virus (MCMV.parental) induzierte in einer Maus unspezifische Antworten. Die Mehrheit der Mäuse wies keine spezifische Antwort gegen Env auf, da MCMV.parental kein F-MuLV Immunogen exprimiert.

Eine Woche nach der Untersuchung der Immunantwort wurden die Mäuse teilweise ein zweites Mal mit 2×10^5 pfu MCMV.env in 300 µl PBS i.p. geimpft (MCMV.env 2x) und die restlichen Mäuse (MCMV.env 1x) nicht. Zwei Wochen später wurden die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten nochmal untersucht. In der unvakzinierten und der MCMV.parental geimpften Kontrollgruppe wurden keine spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten induziert (Abbildung 31 B). Bei den einmalig mit MCMV.env immunisierten Mäusen war die Immunantwort im Vergleich zur ersten Analyse leicht zurückgegangen und die Streuung kleiner. Die Immunantwort der CD4⁺ T-Zellen blieb aber statistisch signifikant erhöht gegenüber den ungeimpften Mäusen. Im Vergleich zu den ungeimpften Mäusen induzierte auch die zweimalige Immunisierung mit MCMV.env starke CD4⁺ T-Zellantworten, dieser Unterschied war statistisch signifikant. Die Mäuse, die ein zweites Mal mit MCMV.env geimpft wurden, zeigten keine Tendenz zur stärkeren Induktion von Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten im Vergleich zu der einmalig immunisierten Gruppe. Lediglich in vier der zweimal geimpften Mäuse wurden erhöhte Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten induziert. Sowohl die einmalige, als auch die Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env induzierten starke Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten. Diese Immunantwort blieb über einen Zeitraum von mehreren Wochen erhalten; die zweite Vakzinierung verstärkte diese Immunantwort kaum.

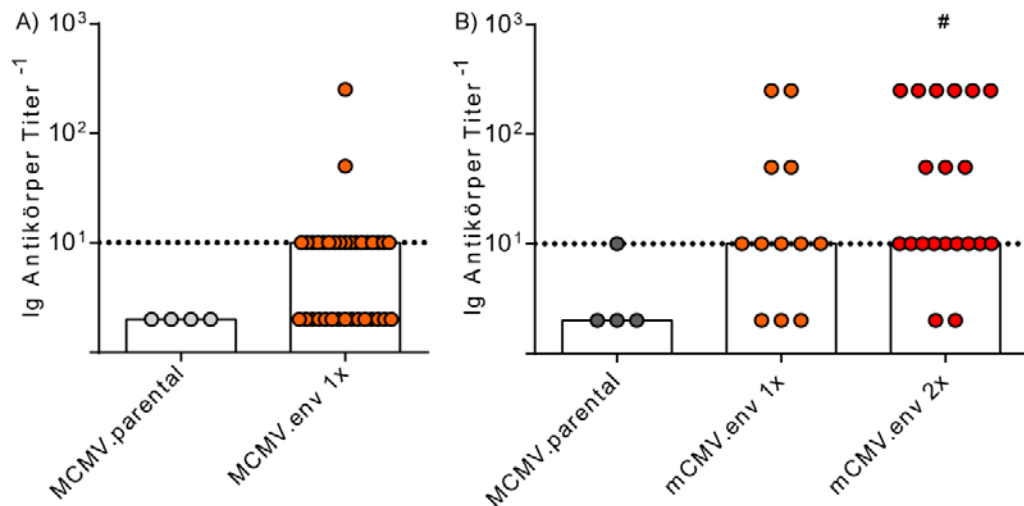


Abbildung 33: Bindende Antikörper nach Prime-Boost Immunisierung mit MCMV.env. Jeweils zwei Wochen nach der ersten Immunisierung (A) und der zweiten Immunisierung (B) der CB6F1-Mäuse mit den angegebenen Viren wurde der Titer der bindenden Antikörper im Blut untersucht. Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus und Mediane sind durch Balken gekennzeichnet. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber MCMV.parental geimpften Tieren sind mit # gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Neben den Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen Immunantworten wurden auch aktivierte CD8⁺ T-Zellen und die Immunantworten der CD8⁺ T-Zellen gegen MHC I-Peptide aus MCMV Proteinen analysiert. Nach der ersten Immunisierung mit MCMV.parental oder MCMV.env wurden vermehrt aktivierte CD8⁺ T-Zellen induziert, dieser Effekt war allerdings nur nach der Impfung mit MCMV.env statistisch signifikant (Abbildung 32 A) gegenüber ungeimpften Mäusen.

Zusätzlich wurde noch die Frequenz von IFN γ -produzierenden Zellen der CD8⁺ T-Zellen untersucht. Nach der ersten Immunisierung wurde in den beiden MCMV geimpften Gruppen eine signifikant höhere Frequenz von IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen induziert (Abbildung 32 B). Nach der zweiten Immunisierung wurden durch MCMV.parental tendenziell mehr CD8⁺ T-Zellen gegenüber der ungeimpften Gruppe induziert; der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant gegenüber ungeimpften Mäusen. Sowohl in den einmal, als auch in den zweimal mit MCMV.env geimpften Mäusen wurden statistisch signifikant mehr aktivierte CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, als in den nicht geimpften Mäusen (Abbildung 32 C). Die Frequenz von IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen war in allen drei geimpften Gruppen gegenüber der nicht geimpften Gruppe statistisch signifikant erhöht (Abbildung 32 D), allerdings war die Frequenz in den MCMV.env geimpften Gruppen tendenziell gegenüber MCMV.parental geimpften Mäusen verringert. Dieser Effekt könnte ähnlich wie bei den Zytokinversuchen beschrieben durch die suppressierenden Eigenschaften von Env hervorgerufen worden sein.

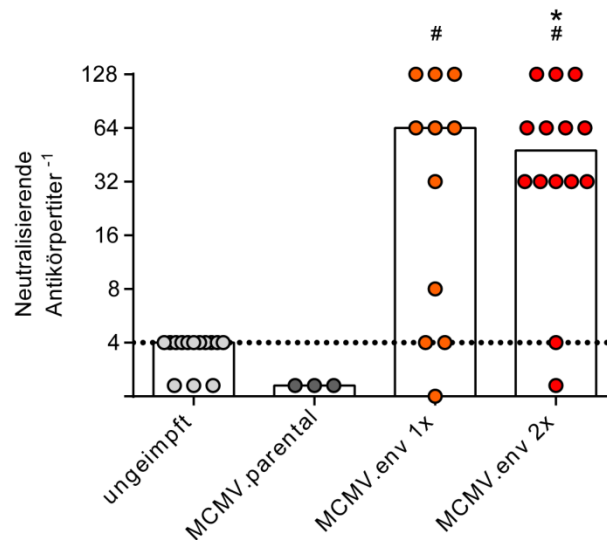


Abbildung 34: Neutralisierende Antikörpertiter an Tag 10 nach der FV Belastungsinfektion.

Zehn Tage nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die neutralisierenden Antikörper im Plasma untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * und gegenüber MCMV.parental geimpften Mäusen mit # gekennzeichnet ($P < 0,05$). Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus und Mediane sind durch Balken gekennzeichnet. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

Im vorangegangenen Experiment konnten zwei Wochen nach der einmaligen Immunisierung mit MCMV.env keine bindenden Antikörper mit gegen F-MuLV Env nachgewiesen werden. Nach der einmaligen Immunisierung mit MCMV.env wurden in der Mehrheit der Mäuse bindende Antikörper in Höhe des Detektionslimits induziert, nur in zwei Mäusen konnten Antikörperantworten oberhalb des Detektionslimits induziert werden (Abbildung 33 A). Der Titer der einmalig geimpften Mäuse veränderte sich drei Wochen später nur leicht, zu diesem Zeitpunkt wiesen mehr als die Hälfte Mäuse detektierbare Antikörpertiter von 1:10 auf (Abbildung 33 B). Die Boost-Immunisierung induzierte starke Antikörperantworten in fast der Hälfte aller immunisierten Mäuse, die statistisch signifikant waren gegenüber den mit MCMV.parental geimpften Mäusen. Das parentale Virus induzierte keine Antikörper gegen F-MuLV Env, da der Vektor kein F-MuLV Immunogen exprimiert.

An Tag 10 nach der Belastungsinfektion wurden die neutralisierenden Antikörper im Plasma bestimmt (Abbildung 34). Die unvakzinierten Mäuse zeigten größtenteils neutralisierende Antikörpertiter am Detektionslimit. Die mit parentalem MCMV geimpften Mäuse wiesen keinen detektierbaren Titer auf. Die einmalig mit MCMV.env geimpften Mäuse wiesen einen erhöhten neutralisierenden Antikörpertiter auf, der gegen MCMV.parental statistisch signifikant war. Die zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse wiesen ebenfalls einen erhöhten neutralisierenden Antikörpertiter auf, der gegenüber ungeimpften und mit MCMV.parental geimpften Mäusen statistisch signifikant war.

4.2.7 Schutz vor der FV-Infektion nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env

Der Verlauf der FV-Infektion wurde durch das Abtasten der Milzen zweimal wöchentlich überprüft (Abbildung 35). Die mit MCMV.parental geimpften Mäuse wiesen über den gesamten Beobachtungszeitraum vergrößerte Milzen, ähnlich der ungeimpften Mäuse auf, wohingegen die Milzen der einmal mit MCMV.env, als auch die der zweimal mit MCMV.env geimpften Tiere kaum vergrößert waren. Der Effekt blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum statistisch signifikant gegenüber ungeimpften Mäusen.

Drei Wochen nach der FV-Infektion wurden die Milzen entnommen und gewogen. Die mit MCMV.parental geimpften Tiere zeigten ähnliche Milzgewichte wie die ungeimpften Tiere, deren Milzen alle stark erhöhte Milzgewichte aufwiesen (Abbildung 36).

Die einmal oder zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse weisen mehrheitlich normale Milzgewichte auf und die Milzen waren statistisch signifikant leichter als die Milzen ungeimpfter Mäuse, die an Splenomegalie leiden.

Die einmal oder zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse weisen mehrheitlich normale Milzgewichte auf und die Milzen waren statistisch signifikant leichter als die Milzen ungeimpfter Mäuse, die an Splenomegalie leiden.

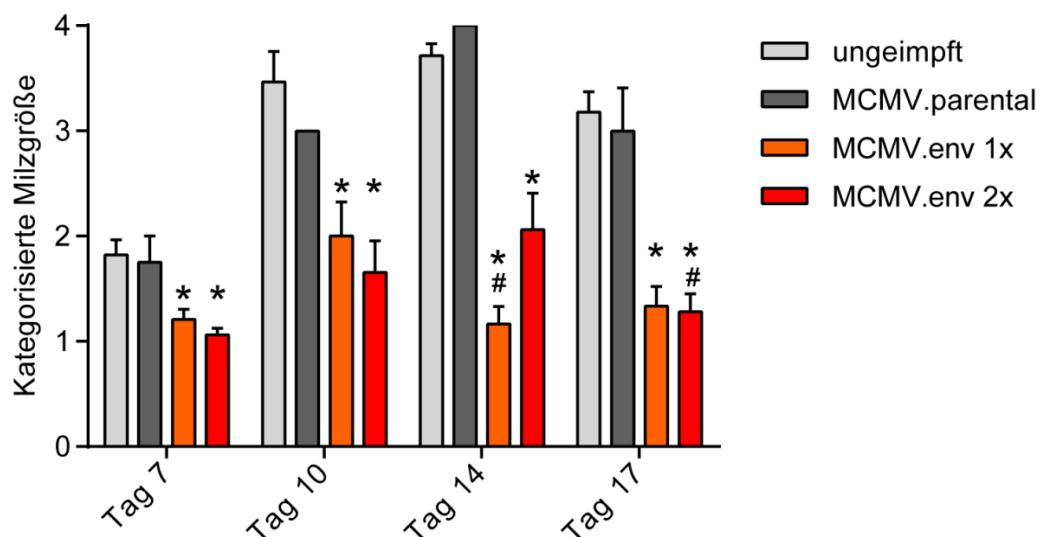


Abbildung 35: Kategorisierte Milzgrößen nach der Prime-Boost Immunisierung mit MCMV.env.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden einmal oder zweimal mit den angegebenen Viren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzgrößen wurden zweimal wöchentlich ertastet und die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet. Die Daten wurden in vier Experimenten erhoben mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe. Die Balken zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwerts an.

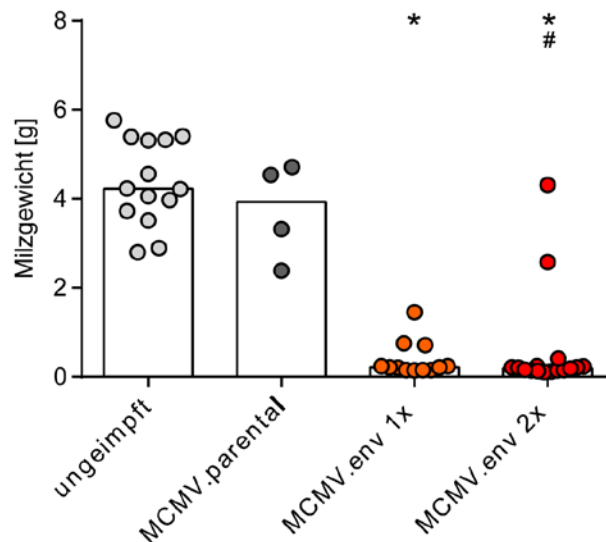


Abbildung 36: Milzgewichte nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env.

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden einmal oder zweimal mit den angegebenen Viren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzen wurden drei Wochen nach der Infektion entnommen und gewogen. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet und gegenüber MCMV.parental geimpften Tieren mit #. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

An Tag 10 der Infektion wurden die Viruslasten im Plasma untersucht. Die mit MCMV.parental geimpften Mäuse zeigten wie die ungeimpften Mäuse sehr hohe Viruslasten. Die meisten einmal oder zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse wiesen im Plasma keine nachweisbare Viruslasten gegenüber den ungeimpften und mit MCMV.parental geimpften Mäusen auf (Abbildung 37 A)

Die Viruslasten in den Milzen wurden drei Wochen nach der FV-Infektion untersucht. Die Impfung mit MCMV.parental erhöhte tendenziell die Viruslasten in der Milz, dieser Effekt war aber nicht statistisch signifikant gegenüber ungeimpften Mäusen. Sowohl die einmalige, als auch die zweimalige Impfung reduzierte die Viruslasten in den Milzen der geimpften Tiere sehr stark. Mehr als die Hälfte der Tiere zeigte Viruslasten unter dem Detektionslimit. Dieser Effekt war sowohl statistisch signifikant gegenüber Mäusen, die mit MCMV.parental geimpft wurden, als auch gegenüber ungeimpften Tieren (Abbildung 37 B).

Das Experiment zeigt, dass die einmalige Immunisierung mit MCMV.env einen effektiven Schutz gegen die FV-Infektion induzieren kann, wenn das Zeitintervall zwischen der Immunisierung und der Belastungsinfektion lang genug ist, um eine komplexe zelluläre und humorale Immunantwort zu induzieren. Die Prime-Boost-Immunisierung war ebenfalls höchst effektiv, konnte den durch die einmalige Vakzinierung induzierten sehr guten Schutz aber nicht mehr verbessern.

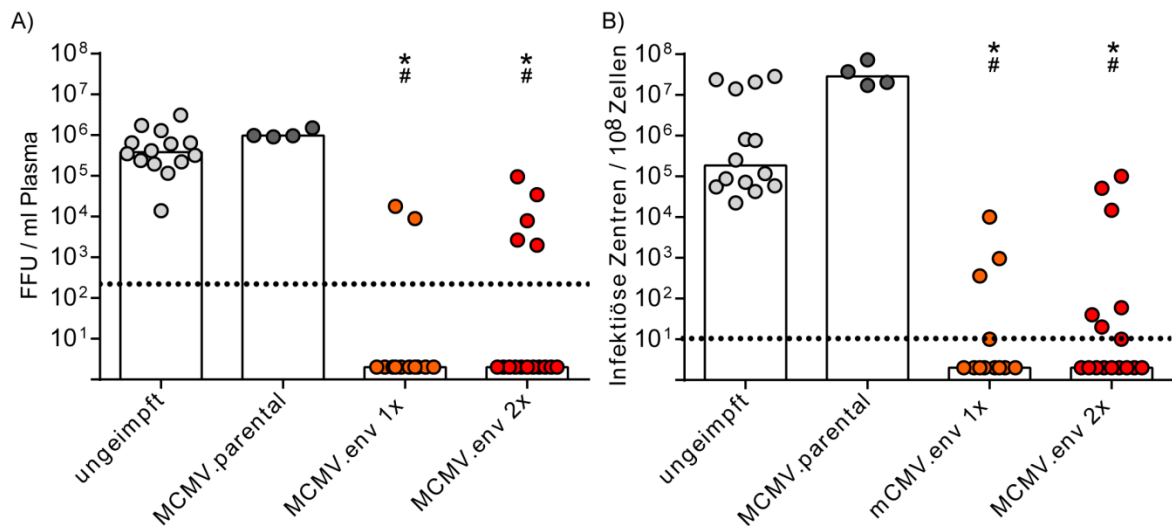


Abbildung 37: Viruslasten im Plasma und in den Milzen MCMV.env-vakzinierter Mäuse.

Freies Virus im Plasma wurde 10 Tage nach Infektion analysiert (A). Zur Bestimmung der Viruslast in den Milzen wurden virusinfizierte Zellen 21 Tage nach Infektion untersucht (B). Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die Daten entstanden in einem Experiment mit 2-5 Mäusen pro Gruppe. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

4.2.8 Transferexperimente

Um den Mechanismus, der hinter dem Schutz der mit MCMV.env geimpften Mäuse steht, zu entschlüsseln wurden Transferexperimente mit $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+$ -depletierten Immunzellen ($CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen, etc.) und mit Serum von zweimal mit MCMV.env geimpften Mäusen durchgeführt. Die Env-spezifischen Immunantworten der zweimal geimpften Mäuse wurden wie zuvor zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung kontrolliert. Die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen $CD4^+$ T-Zellantworten waren tendenziell gegenüber ungeimpften Mäusen erhöht und vergleichbar mit den Antworten in den vorherigen Versuchen (Abbildung 38 A).

Für den Zelltransfer wurden die Zellen mit Hilfe der MACS-Technologie aus der Milz aufgetrennt. Die $CD4^+$ T-Zellen oder die $CD4^+$ -depletierten Immunzellen der Milz wurden einen Tag vor der Belastungsinfektion mit FV in Mäuse transferiert und drei Wochen später die Viruslasten in der Milz bestimmt (Abbildung 38 B). Die Viruslasten der Empfänger-Tiere waren weder nach Transfer der $CD4^+$ T-Zellen, noch nach Transfer der restlichen Zellen reduziert. Die Milzen der zweimal mit MCMV.env geimpften Tiere wiesen dagegen eine verringerte oder nicht mehr nachweisbare Viruslast auf.

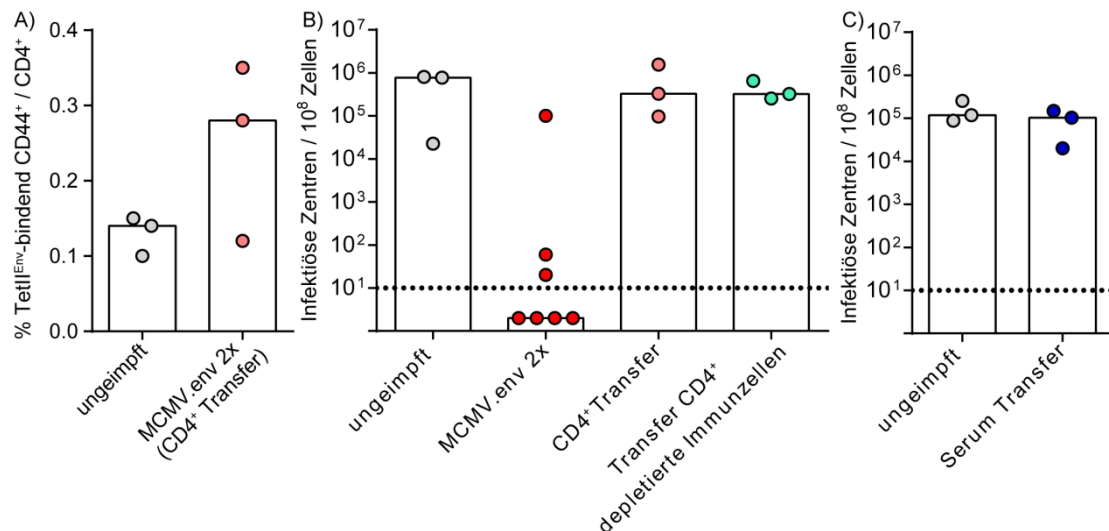


Abbildung 38: Immunantworten und Viruslasten nach dem Transfer von Zellen oder Serum.

Die CD4⁺ T-Zellen von zweimal mit MCMV.env geimpften Mäusen wurden zwei Wochen nach dem Boost auf ihre Env-Spezifität untersucht (A). Die CD4⁺ T-Zellen, die CD4⁺-depletierten Immunzellen oder das Serum aus einer zweimal mit MCMV.env geimpften Maus wurden einen Tag vor der Belastungsinfektion mit FV in Mäuse transferiert und drei Wochen später die Viruslasten in der Milz bestimmt (B, C). Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die Daten entstanden in zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen pro Gruppe. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

Zusätzlich wurde das Serum von drei zweimal mit MCMV.env geimpften Mäusen aus dem Blut isoliert, gepoolt und je 300 µl Serum einen Tag vor der FV-Infektion intravenös in naive Mäuse gespritzt. Drei Wochen später wurden die Viruslasten in den Milzen bestimmt (Abbildung 38 C). Die Viruslasten der Mäuse waren gegenüber den ungeimpften Tieren nicht reduziert.

Die Transferexperimente geben keinen Aufschluss über den Mechanismus des MCMV.env vermittelten Schutzes gegen die FV-Infektion. Der Transfer von einzelnen Komponenten des humoralen oder zellulären Immunsystems einen Tag vor der FV-Infektion vermittelte keinen Schutz.

4.2.9 Analyse der Immunantworten im Langzeitversuch mit MCMV.env

Um sicherzustellen, dass der Schutz der MCMV.env geimpften Mäuse auch über den bisher untersuchten Zeitraum hinaus bestehen bleibt, wurde ein Langzeitversuch über mehr als drei Monate durchgeführt (Abbildung 39). Die CB6F1-Mäuse wurden entweder mit 2×10^5 pfu MCMV.env einmal geimpft oder im Abstand von drei Wochen zweimal geimpft. Je zwei, sechs oder acht Wochen nach der Impfung wurden die zellulären und humoralen Immunantworten im Blut untersucht. Zehn Wochen nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion mit 5000 SFFU FV.

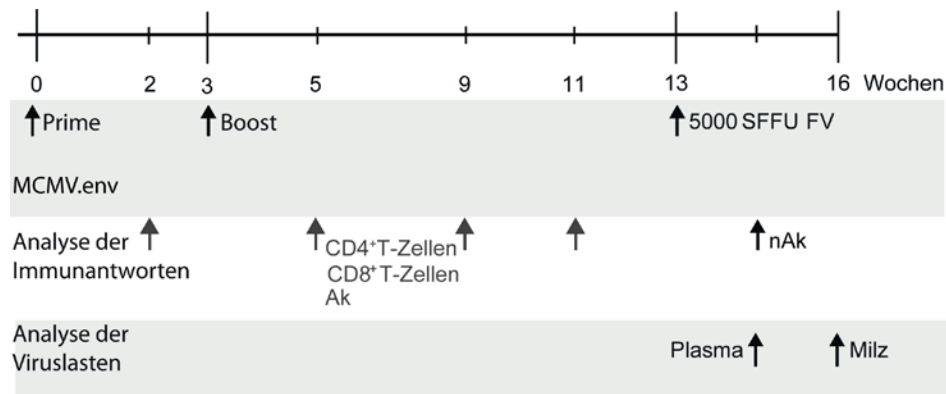


Abbildung 39: Immunisierungsschema des Langzeitversuchs mit MCMV.env.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env intraperitoneal einmal oder im Abstand von drei Wochen zweimal geimpft. Je zwei, sechs oder acht Wochen nach der Impfung wurden die Immunantworten im Blut untersucht. Zehn Wochen nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion mit 5000 SFFU FV. Der Krankheitsverlauf wurde durch Palpation der Milzgrößen dokumentiert. Neutralisierende Antikörper wurden an Tag 10 nach der Infektion analysiert. Die Viruslasten wurden im Plasma und der Milz bestimmt.

Der Krankheitsverlauf wurde durch Palpation der Milzgrößen dokumentiert. Neutralisierende Antikörper wurden an Tag 10 nach der Infektion analysiert. Die Viruslasten wurden im Plasma und der Milz bestimmt. Zwei Wochen nach der ersten Immunisierung wurden Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten von bis zu sieben Prozent gemessen, allerdings war diese Induktion nicht statistisch signifikant gegenüber ungeimpften Mäusen (Abbildung 40).

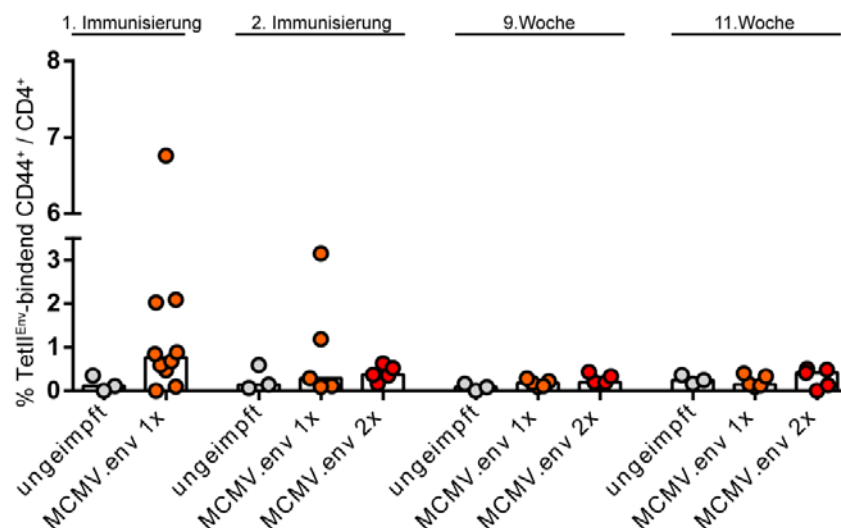


Abbildung 40: Env-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten im Langzeitversuch mit MCMV.env.

Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env intraperitoneal einmal oder im Abstand von drei Wochen zweimal geimpft. Je zwei Wochen nach der ersten oder zweiten Immunisierung, sowie neun und elf Wochen nach der ersten Impfung wurden die Antworten der Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Blut untersucht. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die Daten entstanden in einem Experiment.

Drei Wochen nach der ersten Immunisierung wurde die Hälfte der Mäuse mit MCMV.env ein zweites Mal geimpft und zwei Wochen später die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten wieder untersucht. Die nur einmal mit MCMV.env geimpften Mäuse wiesen dabei stärkere CD4⁺ T-Zellantworten auf, als die zweimal geimpften Mäuse, allerdings war die Frequenz nicht signifikant erhöht gegenüber dieser Gruppe. Die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten waren in beiden Gruppen nur leicht gegenüber den ungeimpften Mäusen erhöht. Nach der dritten und vierten Blutabnahme waren die Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten nicht mehr erhöht gegenüber den ungeimpften Mäusen (Abbildung 40; 9. Woche und 11. Woche).

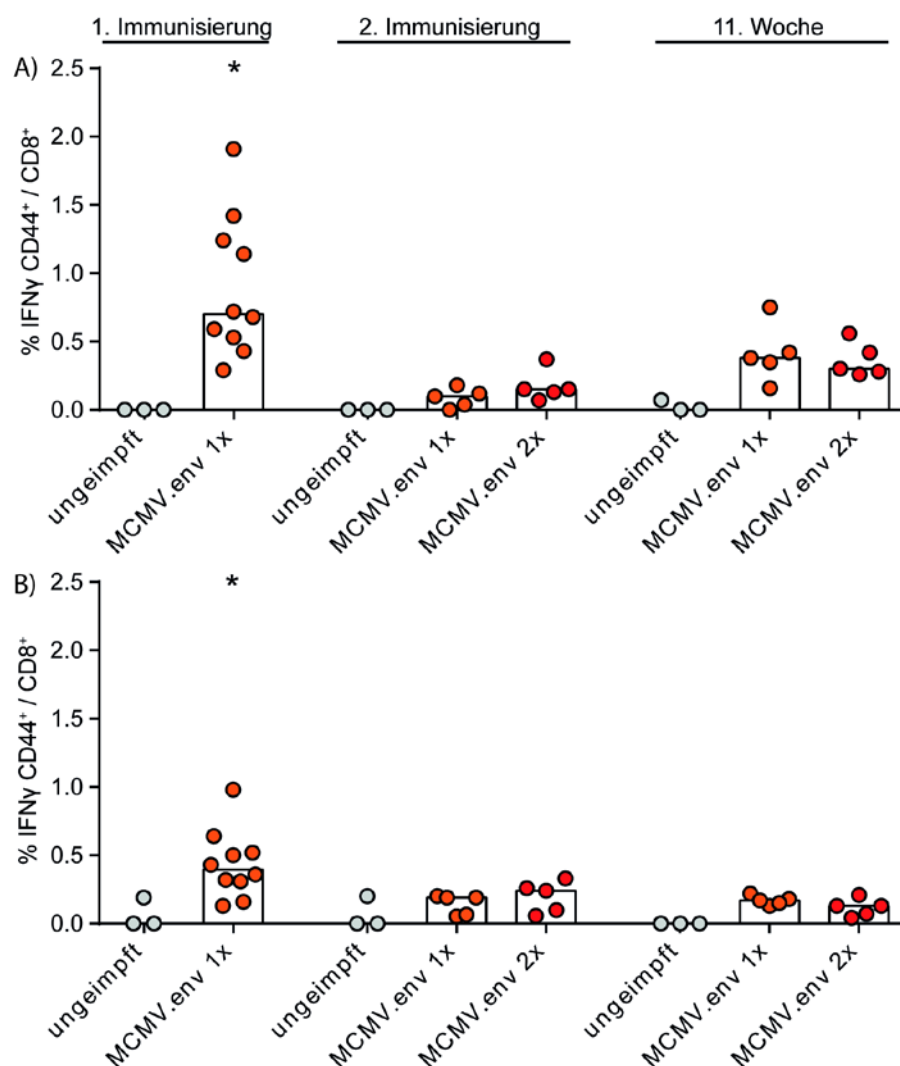
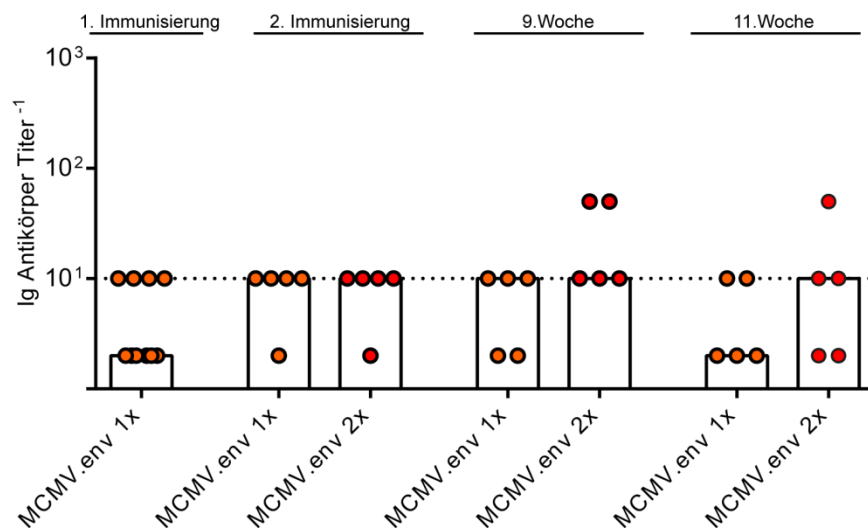


Abbildung 41: MCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten nach zwei verschiedenen Stimulationen.

Zwei Wochen nach der ersten und zweiten Immunisierung, sowie elf Wochen nach der ersten Immunisierung (acht Wochen nach der zweiten) wurden die Immunantworten der MCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut untersucht. Die Zellen wurden dabei entweder mit dem m139 Peptid, das inflationäre CD8⁺ T-Zellantworten induzieren soll (A), oder mit den Peptiden M45, M57, M102 und m141 stimuliert (B). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Mäusen sind mit * gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die Daten entstanden in einem Experiment.



Die CB6F1-Mäuse wurden mit 2×10^5 pfu MCMV.env intraperitoneal einmal oder im Abstand von drei Wochen zweimal geimpft. Je zwei Wochen nach der ersten und zweiten Immunisierung und in der neunten und elften Woche nach der ersten Immunisierung wurden die bindenden Antikörper im Blut untersucht. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit. Die Daten entstanden in einem Experiment.

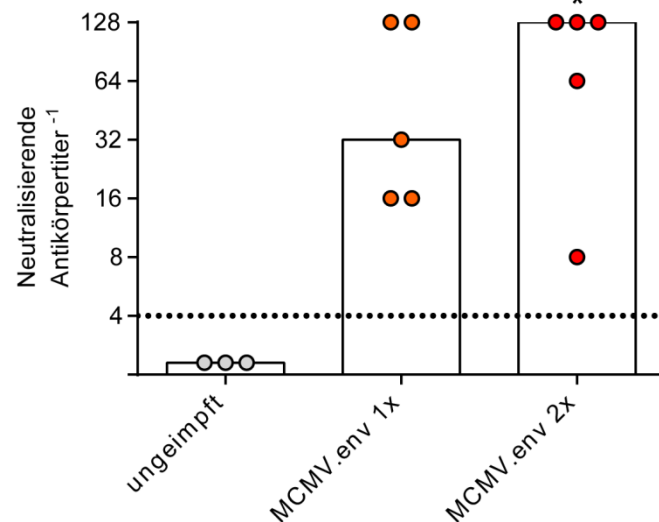


Abbildung 43: Neutralisierende Antikörpertiter an Tag 10 nach der FV Belastungsinfektion.

Zehn Tage nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die neutralisierenden Antikörper im Plasma untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$). Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus und Mediane sind durch Balken gekennzeichnet. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

Elf Wochen nach der ersten Immunisierung gingen die Antikörpertiter in beiden Gruppen weiter zurück.

An Tag 10 nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die neutralisierenden Antikörper im Plasma bestimmt (Abbildung 43). Nach der einmaligen Immunisierung mit MCMV.env wurden tendenziell mehr neutralisierende Antikörper induziert, als in den ungeimpften Mäusen, allerdings war diese Induktion nicht statistisch signifikant. Nach der zweimaligen Immunisierung wurden höhere neutralisierende Antikörpertiter induziert, die statistisch signifikant waren gegenüber der ungeimpften Gruppe.

4.2.10 Schutz vor der FV-Infektion im Langzeitversuch mit MCMV.env

Der Verlauf der FV-Infektion wurde durch das Abtasten der Milzen zweimal wöchentlich überprüft (Abbildung 44). Ab Tag 7 der FV-Infektion waren die Milzen der ungeimpften Kontrollgruppe bis zum Ende des Beobachtungszeitraums stark vergrößert. An Tag 7 waren die Milzen der einmal oder zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse nicht vergrößert. Der Unterschied war in den beiden geimpften Gruppen statistisch signifikant gegenüber den nicht geimpften Mäusen.

Die Milzgrößen der einmal oder zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse blieben im gesamten restlichen Zeitraum reduziert, allerdings nicht statistisch signifikant gegenüber den unvakzinierten Mäusen. An Tag 21 nach der Belastungsinfektion mit FV wurden die Milzen entnommen und gewogen (Abbildung 45).

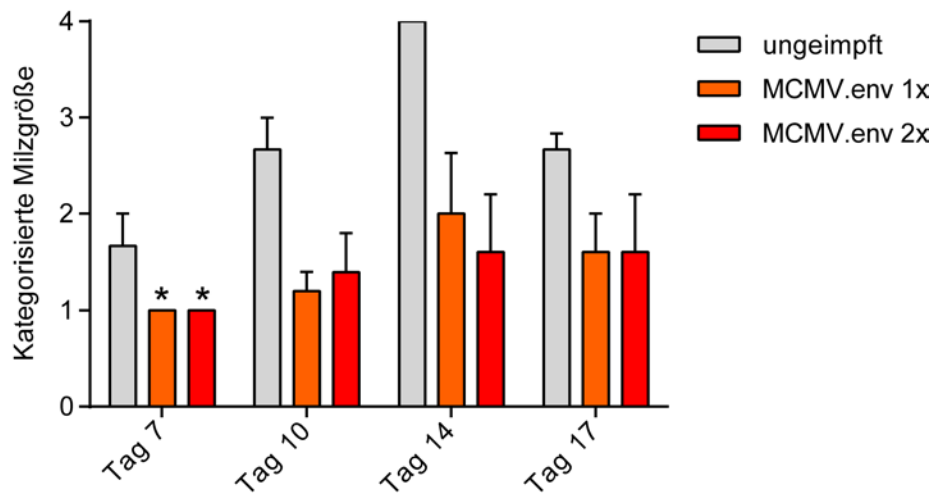


Abbildung 44: Kategorisierte Milzgrößen im Langzeitversuch mit MCMV.env.

Susceptible CB6F1-Mäuse wurden einmal oder zweimal mit den angegebenen Viren immunisiert und zehn Wochen nach der zweiten Immunisierung mit FV infiziert. Die Milzgrößen wurden zweimal wöchentlich ertastet und die Milzgrößen wurden von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert) kategorisiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet. Die Daten wurden in einem Experiment erhoben mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe. Die Balken zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwerts an.

Die ungeimpften Mäuse wiesen zu diesem Zeitpunkt stark vergrößerte Milzen auf. Die einmalig mit MCMV.env vakzinieren Mäuse wiesen größtenteils normale Milzgrößen auf, nur in zwei Mäusen waren die Milzen leicht vergrößert.

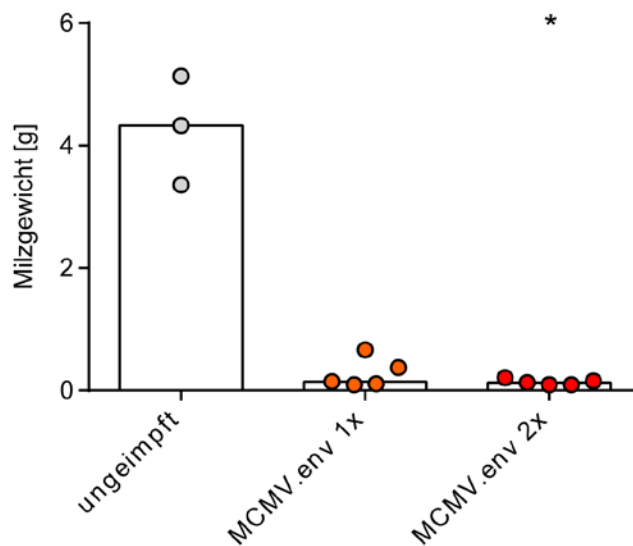


Abbildung 45: Milzgewichte an Tag 21 im Langzeitversuch mit MCMV.env.

Susceptible CB6F1-Mäuse wurden einmal oder zweimal mit den angegebenen Viren immunisiert und mit FV infiziert. Die Milzen wurden drei Wochen nach der Infektion entnommen und gewogen. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber nicht geimpften Tieren sind mit * gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt.

Bei den zweimal mit MCMV.env geimpften Mäusen war nur bei einer Maus das Milzgewicht leicht erhöht, alle anderen Mäuse wiesen normal große Milzen auf und dieser Effekt war signifikant gegenüber der ungeimpften Gruppe.

An Tag 10 wurden die Viruslasten im Plasma untersucht (Abbildung 46 A). Die nicht geimpften Mäusen zeigten alle sehr hohe Viruslasten. In der einmal mit MCMV.env geimpften Gruppe waren in einer Maus erhöhte Viruslasten nachweisbar, die aber immernoch weit unter denen der ungeimpften Mäuse lag. Die restlichen vier Mäuse zeigten alle Viruslasten unterhalb des Detektionslimits. Die Reduktion der Viruslasten war statistisch signifikant gegenüber der ungeimpften Gruppe.

Die Viruslasten der zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse waren in mehr als der Hälfte der Mäuse nicht nachweisbar. Lediglich zwei Mäuse zeigten erhöhte Viruslasten, die aber unter den Viruslasten der ungeimpften Mäuse lagen.

Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Viruslasten in den Milzen bestimmt (Abbildung 46 B). Die unvakzinierten Mäuse zeigten alle sehr hohe Viruslasten in der Milz. In der einmal mit MCMV.env geimpften Gruppen zeigten zwei Mäuse erhöhte Viruslasten und drei Mäuse wiesen nicht nachweisbare Viruslasten auf. Die zweimal mit MCMV.env geimpften Mäuse zeigten in vier von fünf Mäusen nicht nachweisbare Viruslasten und dieser Effekt war statistisch signifikant gegenüber der ungeimpften Gruppe. Im Langzeitversuch mit MCMV.env zeigte sich, dass auch 13 Wochen nach der ersten Immunisierung mit MCMV.env noch ein Schutz der Mäuse vor der FV-Infektion bestand. Die Prime-Boost-Immunisierung konnte diesen Schutz kaum weiter verbessern.

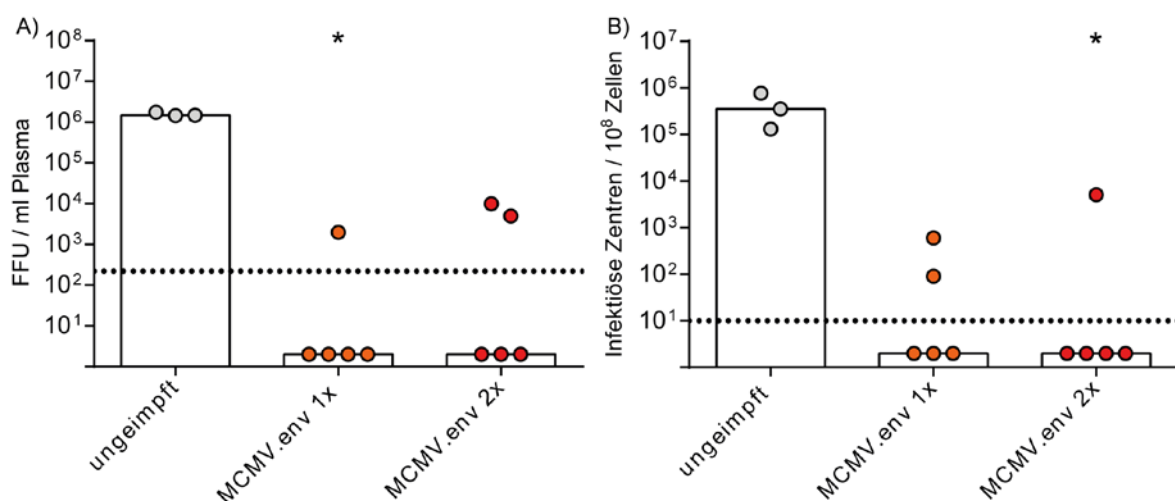


Abbildung 46: Viruslasten im Langzeitversuch mit MCMV.env.

Freies Virus im Plasma wurde 10 Tage nach Infektion analysiert (A). Zur Bestimmung der Viruslast in den Milzen wurden virusinfizierte Zellen 21 Tage nach Infektion untersucht (B). Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus, Mediane sind durch Balken dargestellt. Die Daten entstanden in einem Experiment mit 3-5 Mäusen pro Gruppe. Die gepunktete Linie zeigt das Detektionslimit.

5 Diskussion

Mehr als 36 Millionen Menschen weltweit sind momentan mit HIV infiziert [126]. Obwohl die antiretrovirale Therapie (ART) die Lebenserwartung der meisten HIV-Infizierten erheblich erhöht hat, kann diese Therapie die Infektion nur eindämmen, aber nicht heilen. Bis jetzt konnte kein Impfstoff gegen HIV entwickelt werden. Die Entwicklung eines Impfstoffes ist mit vielen Hürden verbunden, da attenuierte Viren im Fall von HIV aufgrund von Sicherheitsbedenken hinsichtlich der hohen Mutationsrate nicht in Frage kommen. Durch die hohe genetische Diversität entgeht HIV der humoralen und zellulären Immunantwort, da sich Proteinstrukturen sehr schnell verändern. Allerdings gibt es in infizierten Patienten eine partielle Kontrolle der Virusreplikation, die hauptsächlich den zytotoxischen T-Zellen zugeschrieben wird [3, 64]. HIV-1 integriert sich als Provirus sehr schnell in die Wirts-DNA und so entstehen latente Reservoirs, die für das Immunsystem nicht zugänglich sind [29]. Nur etwa 20 % der HIV-Patienten entwickeln neutralisierende Antikörper; diese sind aber nicht in der Lage die Progression der HIV-Erkrankung effektiv zu begrenzen, da HIV Env stark glykosyliert ist und daher konservierte Bindungsstellen nur schwer zugänglich sind [97]. Auch regulatorische T-Zellen spielen in der HIV-Infektion eine Rolle, da sie sowohl die T-Zellantworten direkt beeinflussen, als auch durch die Ausschüttung supprimierender Zytokine das Zytokinmilieu negativ verändern [69, 114]. Diskutiert werden auch immunsuppressive Mechanismen, die wahrscheinlich durch eine immunsuppressive Domäne im transmembranen Hüllprotein gp41 von HIV induziert werden [86] und die Proliferation von Lymphozyten beeinflussen. Für die Impfstoffentwicklung fehlt außerdem ein geeignetes Kleintiermodell, da normale Mäuse nicht suszeptibel sind für HIV [18]. Daher findet die Forschung größtenteils in Affenmodellen statt. Allerdings sind sowohl die genetische Heterogenität der Tiere, als auch deren Anzahl und Haltung problematisch. In dieser Arbeit wurde daher auf das murine FV-Modell zurückgegriffen, das eine genetische Homogenität der Tiere und damit eine Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse sicherstellt. Bei FV handelt es sich im Vergleich zu HIV zwar um ein einfach aufgebautes Retrovirus, aber auch das FV induziert eine chronische Infektion, da die Infektion von Immunsystem zwar kontrolliert, aber nicht vollständig eliminiert wird. Auch im FV-Modell spielen Tregs eine entscheidende Rolle, da sie zelluläre Immunantworten supprimieren, das Zytokinmilieu verändern und damit die Entstehung einer chronischen FV-Infektion begünstigen [63, 91, 130]. Den „Goldstandard“ in der Vakzine-Entwicklung im FV-Modell stellt die prophylaktische Impfung mit attenuierten Impfvirus F-MuLV-N dar, das sowohl CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen als auch Antikörper

induziert und dadurch einen sehr guten Schutz vermittelt [35]. Allerdings werden auch durch F-MuLV Env suppressierende Effekte vermittelt, die bei der Entwicklung von Immunisierungsstrategien berücksichtigt werden müssen [67]. Ähnlich wie in der HIV-Vakzine-Entwicklung wurden auch im FV-Modell Adenovirus-basierte Vektoren als Impfstoffe getestet. In diesem Modell zeigte sich auch der Einfluss der immunsuppressiven Domäne von Env auf den Impferfolg bei der Ko-Applikation mit anderen Immunogenen [10]. Die Ko-Applikation mit einem Env-kodierenden adenoviralen Vektor reduzierte die Immunantworten von CD8⁺ T-Zellen gegen ein gleichzeitig oder später injiziertes Immunogen (GagL). Allerdings verringert auch die Immunisierung mit einem gp70-kodierenden adenoviralen Vektor, der nicht die im Transmembran-Env Protein enthaltene immunsuppressive Domäne kodiert, die Immunantworten von CD8⁺ T-Zellen gegen ein zweites Immunogen [67], was darauf schließen lässt, dass die immunsuppressive Domäne keine vollständige Erklärung der Immunsuppression darstellt. In diesem Modell konnte außerdem gezeigt werden, dass die Env-spezifischen CD4⁺ T-Zellen das Zytokin Milieu durch die Ausschüttung des suppressiven Interleukins 10 modulieren [96]. Wir haben DNA-Plasmide verwendet, die verschiedene Antigene und Adjuvantien exprimieren, um den Einfluss verschiedener Impfstoffkomponenten auf die Impfstoff-induzierten zellulären und humoralen Immunantworten zu untersuchen. Um das Zytokin Milieu so zu modulieren, dass eine Induktion von CD8⁺ T-Zellantworten gegen GagL₈₅₋₉₃ trotz der suppressiven Eigenschaften von Env möglich ist, wurde eine DNA-Immunisierung mit LG + Env in Kombination mit Zytokin kodierenden Plasmiden durchgeführt. Die ausgewählten Zytokine IL1 β , IL2, IL12, IL15, IL18, IL21, IL28A und GM-CSF sind für die Induktion von potenten CD8⁺ T-Zellantworten bekannt [26, 33, 41, 112, 128]. Die Ko-Applikation von IL1 β , IL15 und IL18 zeigte nur moderate Effekte auf die Induktion von GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, wohingegen IL2, IL12, IL21 und IL28A diese CD8⁺ T-Zellantworten in den meisten der ko-immunisierten Mäuse verstärken konnten. Den stärksten Effekt zeigte die Ko-Applikation von LG + Env in Kombination mit GM-CSF. GM-CSF wurde bereits in anderen DNA- oder Adenovirus-basierten Immunisierungen als Adjuvanz beschrieben [1, 2, 14, 118]. In diesen Studien wurde der steigernde Effekt von GM-CSF auf die CD8⁺ T-Zellantworten beschrieben, der wahrscheinlich indirekt durch den Einfluss von GM-CSF auf die Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen ausgelöst wird [123]. Die Ko-Immunisierung mit Zytokinen sollte nicht nur die Induktion von CD8⁺ T-Zellantworten in Gegenwart von Env verbessern, sondern auch andere Immunantworten nicht negativ beeinflussen, da man davon ausgeht, dass ein potenter

Impfstoff sowohl humorale, als auch zelluläre Immunantworten induzieren sollte [14, 35, 36, 103, 122]. Keines der getesteten Zytokine hatte einen negativen Einfluss auf die Antikörperbildung. Die Ko-Applikation mit GM-CSF induzierte sogar einen höheren Titer an bindenden Antikörpern. GM-CSF wurde nicht nur für seinen positiven Einfluss auf die Induktion von CD8⁺ T-Zellen, sondern auch auf Antikörperantworten beschrieben [2, 34].

Die Ko-Immunisierung von LG + Env mit IL1 β , IL12, IL15, IL21, IL28A und GM-CSF schützte die Mäuse am effizientesten vor der FV-Infektion. Der Schutz wurde wahrscheinlich vor allem durch die Induktion von CD8⁺ T-Zellen vermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Zytokine die Immunsuppression durch Env modulieren können und ein gutes Werkzeug bei der Entwicklung von retroviralen Impfstoffen darstellen. Die immunsuppressive Domäne (Isu) ist hochkonserviert unter den Retroviren [30], auch für HIV-1 wird eine Isu im Transmembranprotein gp41 diskutiert. Versuche mit Homopolymeren aus der entsprechenden Isu von gp41 zeigten *in vitro* inhibierende Effekte auf Monozyten und B-Zellen. Die Bindung an diese Zellen konnte durch Substitutionen in der Aminosäuresequenz der Peptide moduliert werden [86]. Die Inkubation mit rekombinantem gp41 induzierte auch eine erhöhte Ausschüttung des supprimierenden IL10 durch Monozyten [6, 85]. Die Immunisierung von Ratten mit Wildtyp- und in der Isu-mutiertem gp41 zeigte eine erhöhte Antikörperantwort in den Ratten, die mit dem mutierten gp41 geimpft wurden [85]. Allerdings zeigte im FV-Modell auch die Immunisierung mit gp70 im adenoviralen Hintergrund supprimierende Effekte auf die Induktion von CD8⁺ T-Zellen durch Ad.TxnGagL oder Ad.Gag_{CIK}, obwohl gp70 nicht die im Transmembran-Env Protein enthaltene Isu kodiert [67]. Es scheint also in Env noch andere immunsuppressive Mechanismen unabhängig von der Isu zu geben, die bisher aber noch nicht entschlüsselt wurden. Die immunsuppressiven Eigenschaften von Env könnten eventuell auch bei einer Immunisierung gegen HIV-1 durch die Ko-Applikation mit genetischen Adjuvantien wie Zytokinen moduliert werden, da Zytokine in der Maus und im Menschen häufig ähnliche Wirkung haben.

Zurzeit stellt ein vektorieller Impfstoff auf der Basis von RhCMV, der SIV Proteine exprimiert, das beste Werkzeug zum Schutz gegen eine dem HIV verwandte SIV-Infektion dar. Dieser Vektor induzierte nach der prophylaktischen Immunisierung unkonventionelle CD8⁺ T-Zellantworten [51], die über 50 % der vakzinierten Affen gegen eine SIV-Infektion schützten. Um die CMV-basierte Immunisierung im FV-Modell zu evaluieren, wurden MCMV-basierte Vektoren eingesetzt, die F-MuLV Leader-Gag in nativer und modifizierter Form, sowie F-MuLV Env exprimieren. Die Prime-Boost-Immunisierung mit

MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag_{C1K} induzierte keine Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten und dadurch keinen Schutz gegen eine FV-Infektion. Während der akuten FV-Infektion sind bis zu 15% der aktivierten CD8⁺ T-Zellen Gag_{L85-93}-spezifisch [131]. Trotz der Immundominanz des Gag_{L85-93} Epitops während der natürlichen FV-Infektion konnte auch nach der prophylaktischen Vakzinierung mit Adenovirus (Ad)-basierten Vektoren, die das Leader-Gag Protein exprimierten, keine Induktion von Gag_{L85-93}-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine Induktion dieser CD8⁺ T-Zellen nach der Impfung mit Ad.Gag_{C1K} erzielt werden [45]. Bei dem modifizierten Leader-Gag Protein Leader-Gag_{C1K} wurde das Tyrosin an der das Epitop C-terminal flankierenden Position C + 1 durch ein Lysin ersetzt, wodurch der proteasomale Abbau und die Präsentation via MHC I verbessert wurde [93]. MCMV besitzt allerdings 26 immundominante CD8⁺ T-Zellepitope [89], die wahrscheinlich einer Immunantwort gegen das schwächere Gag_{L85-93} Epitop entgegen wirken, daher konnte wahrscheinlich weder das native Leader-Gag Protein, noch die modifizierte Variante Leader-Gag_{C1K}, potente Gag_{L85-93}-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten induzieren und auch keinen Schutz vermitteln. Um die Erkennung der Proteine Leader-Gag und Leader-Gag_{C1K} durch das Immunsystem weiter zu verbessern wäre die Fusion mit immunmodulatorischen Proteinen denkbar. Im adenoviralen Hintergrund konnte gezeigt werden, dass die Fusion von Gag_{L85-93} mit dem immunmodulatorischen, bakteriellen Protein Thioredoxin die Induktion von Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen stark verbessert [45]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass genetische Adjuvantien wie Zytokine die Induktion von CD8⁺ T-Zellen und damit den Schutz vor der FV-Infektion stark verbessern können. Auch im MCMV-Hintergrund wäre eine Kombination der Proteine Leader-Gag und Leader-Gag_{C1K} mit genetischen Adjuvantien denkbar, um die Immunantwort zu modulieren und den Schutz zu verbessern.

Um eine komplexe Immunantwort zu induzieren wurde außerdem MCMV.env verwendet, das F-MuLV Env exprimiert und die meisten CD4⁺ T-Zellepitope enthält [81]. Im Gegensatz zu der Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV-Leader-Gag_{C1K} konnte mit MCMV.env ein sehr guter Schutz gegen eine FV-Infektion induziert werden, allerdings erst wenn genügend Zeit zwischen der Immunisierung und der Belastungsinfektion mit FV vergangen war. Die Vakzinierung induzierte außerdem MCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten, deren Zytokin-Produktion durch MCMV.env gedämpft wurde. Im CMV-Hintergrund zeigte sich also auch ein supprimierender Effekt von F-MuLV Env wie bei der DNA-Immunisierung. Aus der nativen FV-Infektion ist bekannt, dass die

neutralisierenden Antikörper erst nach der $CD4^+$ T-Zellantwort und den zytotoxischen T-Zellen induziert werden [56]. Die Differenzierung der B Zellen in Antikörper-sekretierende Plasmazellen ist stark von follikulären T-Helferzellen abhängig [27, 32]. Die follikulären T-Helferzellen initiieren die Bildung von germinalen Zentren, in denen B-Zellen nach Antigenkontakt proliferieren und sich zu Plasmazellen differenzieren. Um die zeitliche Komponente bei der Reifung von B-Zellen zu berücksichtigen, wurde der zeitliche Abstand zwischen der Immunisierung mit MCMV.env und der Belastungsinfektion mit FV von drei auf sechs Wochen erhöht. Zusätzlich wurde diese Immunisierungsstrategie mit einem homologen Prime-Boost-Schema verglichen, da aus verschiedenen Modellen bekannt ist, dass eine Prime-Boost-Immunisierung den Schutz gegen die Infektion gegenüber der einmaligen Immunisierung verbessert [28, 74, 110]. Die einmalige Immunisierung induzierte auch hier gute Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische $CD4^+$ T-Zellantworten, die durch eine zweite Immunisierung nicht verbessert werden konnten. Im Gegensatz zum ersten Experiment induzierte eine einmalige Immunisierung mit einem verdoppelten Zeitintervall zwischen Immunisierung und Belastungsinfektion messbare bindende Antikörper, deren Frequenz durch die zweite Immunisierung noch verbessert wurde. Dieser Effekt zeigte sich auch bei den neutralisierenden Antikörpern. Das verlängerte Zeitintervall zwischen der einmaligen Immunisierung und der Infektion mit FV hat wahrscheinlich den B Zellen mehr Zeit für die Reifung in Antikörper-sekretierende Plasmazellen gelassen und zur Verbesserung der Antikörperantworten durch somatische Hypermutation geführt. Bei der Prime-Boost-Immunisierung wird durch den Boost noch mehr Antigen in den Organismus eingebracht wodurch die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von B-Zellen und T-Helferzellen mit dem Antigen erhöht wird. B Zellen, die ein Antigen gebunden haben, wandern in das Lymphgewebe und somit in die T-Zell-Zonen ein und werden dort durch aktivierte T-Helferzellen eingefangen. Der Zell-Zell-Kontakt führt zur Aktivierung und Reifung der B Zellen zu Antikörper-sekretierende Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B Zellen, die sich in germinalen Zentren durch Proliferation weiter vermehren [61]. Bei jeder weiteren Exposition mit dem Antigen erhöht sich auch die Anzahl der aktivierten B-Zell-Klone und damit die Menge sekretierter Antikörper, dadurch lässt sich die Verbesserung der Antikörperantworten gegenüber der einmaligen Immunisierung mit MCMV.env erklären. Die Boost-Immunisierung mit MCMV.env verbesserte allerdings nicht den Schutz der Mäuse gegen eine FV-Infektion im Vergleich zur einmaligen Immunisierung. Die Verdopplung des Zeitintervalls zwischen der einmaligen Immunisierung und der Belastungsinfektion mit FV führte zu einer Verbesserung der Antikörperantworten gegenüber dem kurzen Zeitintervall

von drei Wochen und verbesserte dadurch den induzierten Schutz gegen die FV-Infektion. Transferexperimente mit $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+$ -depletierten Immunzellen und antikörperhaltigem Serum sollten zeigen, mit welchem Teil des Immunsystems der mit MCMV.env induzierte Schutz korreliert. In keinem der Transferexperimente konnte eine Reduktion der Viruslasten erreicht werden. Nach der Immunisierung mit F-MuLV-N wurden in der Vergangenheit schon Transferexperimente durchgeführt [36]. Auch hier reichte der Transfer einzelner Teile des Immunsystems einen Tag vor der Belastungsinfektion mit FV nicht aus, um einen vollständigen Schutz gegen die FV-Infektion zu induzieren. Zwar korrelierte der partielle Schutz in diesen Experimenten 8 Tage nach der Infektion mit dem neutralisierenden Antikörpertiter, aber der Transfer von $CD19^+$ -positiven B Zellen oder dem neutralisierenden Antikörper mAb48 konnte keinen vollständigen Schutz vermitteln, sondern die Viruslast gegenüber ungeimpften Mäusen lediglich leicht verringern. Auch der Transfer von zwei Teilen des Immunsystems wie $CD4^+/CD19^+$ -positive Zellpopulationen konnte keinen vollständigen Schutz induzieren. Der Transfer von $CD8^+$ T-Zellen reduzierte die Viruslasten im Plasma am stärksten, schützte aber auch nicht vollständig vor einer Splenomegalie. Erst der Transfer von $CD4^+/CD8^+/CD19^+$ -positiven Zellpopulationen oder von allen Immunzellen aus der Milz konnte einen vollständigen Schutz wie F-MuLV-N vermitteln. Der durch F-MuLV-N vermittelte Schutz entstand durch die Fähigkeit alle drei Arme des Immunsystems zu stimulieren. Ein Transfer der Gesamt-Immunzellen aus der Milz von MCMV.env-immunisierten Mäusen sollte auch im Anschluss an diese Arbeit durchgeführt werden, um den Mechanismus hinter dem durch MCMV.env vermittelten Schutz zu entschlüsseln. Alternativ könnten auch Depletionsexperimente durchgeführt werden, bei denen einzelne Arme des Immunsystems durch Antikörper gezielt ausgeschaltet werden, um die Auswirkungen einer FV-Infektion in MCMV.env-immunisierten und depletierten Mäusen zu untersuchen.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit dem Wildtyp MCMV-Stamm Smith und der Superinfektion mit FV die FV-Viruslast in den superinfizierten Mäusen gegenüber den nur mit FV-infizierten Mäusen verringert war [42]. Die vorangegangene MCMV-Infektion modulierte vor allem NK-Zellen und deren $IFN\gamma$ -Ausschüttung. Das erhöhte $IFN\gamma$ -Level hatte wahrscheinlich einen eigenen antiviralen Effekt und einen positiven Effekt auf die FV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen, wodurch die FV-Viruslast im Vergleich zu prä-naiven Mäusen verringert wurde. Um zu zeigen, dass der vermittelte Schutz nach der MCMV-basierten Immunisierung auf FV-spezifische Immunantworten zurückführen ist und nicht auf Effekte von heterologer Immunität wurde

MCMV.parental als Kontrolle mitgeführt. MCMV.parental induzierte nach der Immunisierung eine hohe Frequenz von IFN γ in den induzierten MCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, hatte aber keinen Einfluss auf die FV-Infektion. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Deletion in *m157* zurückzuführen, da durch die Deletion in *m157* keine NK-Zellen aktiviert werden sollten [73]. Der Schutz gegen eine FV-Infektion wurde also wahrscheinlich nur durch F-MuLV Env-spezifische Immunantworten vermittelt.

Der Langzeitversuch mit MCMV.env konnte zeigen, dass die Impfung auch noch drei Monate nach der Immunisierung die Mäuse vor den Auswirkungen einer FV-Infektion schützen kann. Die Impfung induzierte vor allem neutralisierende Antikörper. Die Impfungen mit RhCMV/SIV schützten die geimpften Affen über ein Jahr hingegen durch die Induktion von starken Effektor-Gedächtnis-T-Zellantworten. Die meisten Impfungen müssen im Durchschnitt nach 10 Jahren aufgefrischt werden, da die Zahl der induzierten Gedächtnis-B-Zellen mit der Zeit verringert. Nach der Impfung mit MCMV.env sollte die Induktion von neutralisierenden Antikörpern ohne Belastungsinfektion untersucht und eventuell deren Stabilität über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Auch die induzierten T-Zellen könnten auf Effektor- und Gedächtnis-Marker untersucht werden [116].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich MCMV-basierte Impfungen auch auf das FV-Modell übertragen lassen. In Versuchen mit Makaken wurde bereits ein RhCMV-basierter Impfstoff, der SIV Proteine exprimiert, erfolgreich gegen eine SIV-Infektion eingesetzt [48, 49]. Möglicherweise induzierte das RhCMV-basierte Vakzin auf Grund seiner Anpassung an Fibroblasten CD8⁺ T-Zellantworten, die sich gegen unkonventionelle CD8⁺ T-Zellepitope richteten, da sie MCH II- oder MHC E-restringiert waren [51]. Voruntersuchungen mit dem ebenfalls an Fibroblasten adaptierten Towne/Toledo HCMV-Stamm induzierten in einer klinischen Studie nur konventionelle Immunantworten bezogen auf die präsentierten Epitope und die MHC-Restriktion [90]. Es bleibt also abzuwarten, welche Ergebnisse sich im Menschen erzielen lassen. Im FV-Modell bleibt nach den Transferexperimenten offen, mit welchen Immunantworten der Schutz korreliert. Im SIV-Modell wurde durch die Verwendung von MHC I- und MHC II-blockierenden Antikörpern nach der Impfung die ungewöhnliche Restriktion der induzierten CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen [50]. Ein derartiges Experiment wäre auch mit MCMV.env denkbar, bei dem zunächst die MHC II-basierten T-Zellantworten geblockt werden sollten, um zu sehen, ob weiterhin ein Schutz induziert wird. Eventuell spielen auch bei MCMV ungewöhnliche Immunantworten eine Rolle bei der Induktion des Schutzes gegen die FV-Infektion. Im Vergleich zu anderen Vektor-basierten Impfstoffen induzierte die Impfung mit MCMV.env

alleine schon einen sehr guten Schutz gegen die FV-Infektion. Die Impfung induzierte außerdem sehr hohe Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten. Der adenovirale Vektor Ad5.pIXgp70 alleine reduzierte bereits die Splenomegalie in den geimpften Mäusen. Der Schutz konnte allerdings nach der Ko-Applikation mit verschiedenen Interleukinen als genetische Adjuvantien stark verbessert werden, da vor allem die neutralisierenden Antikörperantworten verbessert wurden [95]. Der Vektor induzierte auch Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten, die aber schwächer waren, als nach der Impfung mit MCMV.env [11, 95]. Anders als im MCMV-Hintergrund induzierte Leader-Gag_{C1K} nach der Modifikation der einzelnen Aminosäure im adenoviralen Hintergrund potente GagL₈₅₋₉₃-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten und konnte die Viruslasten in den infizierten Mäusen signifikant reduzieren. Die Mischung beider adenoviraler Vektoren induzierte aufgrund der supprimierenden Effekte von F-MuLV Env zunächst keine GagL₈₅₋₉₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten, allerdings konnte dieser Effekt durch eine sequenzielle Immunisierung, bei der mit Ad.pIXgp70 erst später geimpft wurde, aufgehoben werden [67]. Im MCMV-Hintergrund könnte die Kombination beider Immunogene erst getestet werden, wenn die Peptid-Kompetition zwischen Leader-Gag und MCMV-Peptiden überwunden wurde, z.B. durch die Kopplung von Leader-Gag an andere immunogene Proteine. Allerdings ist zu erwarten, dass sich auch im MCMV-Hintergrund die immunsuppressiven Eigenschaften von Env auf die CD8⁺ T-Zellantworten gegen GagL₈₅₋₉₃ zeigen. Um die Immunsuppression zu überwinden, könnte auch hier wie im adenoviralen Hintergrund sequenziell geimpft werden oder man könnte Zytokine als genetische Adjuvantien einsetzen, wie für die DNA-Immunisierung in dieser Arbeit gezeigt. Die Kombination von MCMV-basierten Impfstoffen, die sowohl CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und neutralisierende Antikörper induzieren, könnte eventuell an den durch F-MuLV-N induzierten Schutz heranreichen, da MCMV.env beispielsweise stärkere Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten induzierte als Ad5.pIXgp70 in Kombination mit Interleukinen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse für die anti-retrovirale Impfstoffentwicklung, die wichtige Fortschritte für die HIV-Impfstoffentwicklung mit sich bringen könnten. Der Einsatz von DNA-Impfstoffen, die mit Zytokin-kodierenden Plasmiden kombiniert werden, kann auch im Menschen verwendet werden, da die Funktionen von Zytokinen bei Menschen und Mäusen sehr ähnlich sind. Die Veränderungen im Zytokinemilieu sind durch die Injektion in den Muskel und die Elektroporation örtlich begrenzt, so dass keine systemischen Nebenwirkungen zu erwarten wären. Die Mäuse zeigten keine Anzeichen für eine Toxizität der Zytokine. Auch virale

Vektoren wurden in der HIV-Forschung schon verwendet, um Immunogene dem Immunsystem zu präsentieren. Das in dieser Arbeit verwendete MCMV ist allerdings replikationskompetent und das könnte die Übertragung auf den Menschen erschweren. CMV-basierte Vektoren sind vor allem nach den sehr guten Ergebnissen der prophylaktischen Immunisierung im SIV-Modell in den Fokus gerückt. Allerdings ist eine Ko-Infektion mit HCMV in HIV Patienten problematisch, da diese durch die HIV-Infektion immunsupprimiert sein können und es dadurch zur Reaktivierung von HCMV kommen kann [17, 83]. Die HAART-Therapie hat allerdings zu einer massiven Abnahme von Todesfällen, die durch eine opportunistische HCMV-Infektion hervorgerufen wurden, geführt [7, 46]. Daher ist es sehr wichtig, die eventuellen Folgen einer HCMV-basierten prophylaktischen Vakzine gegen HIV auf die Patienten zu berücksichtigen. Im Menschen sollte daher auf replikationsinkompetente virale Vektoren zurückgegriffen werden. Auf Grund der sehr guten Resultate in Affen-Studien, sowie den im FV-Modell durchgeführten Experimenten sind CMV-basierte Vektoren als sehr vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes anzusehen.

6 Zusammenfassung

Die Suppression von Immunantworten gegen ein gleichzeitig appliziertes Immunogen durch retrovirales Env stellt ein herausforderndes Problem in der anti-retroviralen Impfstoffentwicklung dar. Im FV-Modell wurden daher DNA-Impfstoffe, die F-MuLV Env und Leader-Gag exprimierten, mit Zytokin-kodierenden Plasmiden kombiniert. Die Ko-Immunisierung mit Zytokin-kodierenden Plasmiden modulierte den supprimierenden Effekt von Env auf die Induktion von Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, vor allem die Kombination LG + Env mit den Zytokinen IL2, IL12, IL21, IL28A und GM-CSF führte zur Induktion von hohen spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten. Dies zeigte sich nach der FV-Infektion in niedrigeren Milzgewichten, sowie in verringerten Viruslasten in der Milz. GM-CSF modulierte die Bildung bindender Antikörper positiv, alle anderen Zytokine hatten keinen Einfluss auf die Bildung bindender Antikörper. Die Ko-Applikation von Zytokinen könnte eine Lösung der Problematik der Immunsuppression durch Env nicht nur im FV-Modell, sondern auch bei Immunisierungen gegen HIV darstellen, da beispielsweise die immunsuppressive Domäne hochkonserviert zwischen verschiedenen Retroviren ist.

Nicht nur die Immunsuppression der Retroviren stellt eine Herausforderung bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen retrovirale Infektionen dar, sondern auch die Induktion komplexer Immunantworten. In der Forschung induziert ein vektorieller Impfstoff auf der Basis von RhCMV, der SIV Proteine exprimiert, den besten Schutz gegen eine dem HIV verwandte SIV-Infektion. Um die CMV-basierte Immunisierung im FV-Modell zu evaluieren, wurden MCMV-basierte Vektoren eingesetzt, die Leader-Gag, Leader-Gag_{C1K} oder F-MuLV Env exprimieren. Die homologe Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag oder MCMV.Leader-Gag_{C1K} konnte keine Gag_{L85-93}-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten induzieren und vermittelte keinen Schutz gegen die FV-Infektion. MCMV.env induzierte dagegen starke Env₁₂₃₋₁₄₁-spezifische CD4⁺ T-Zellantworten. Allerdings konnte MCMV.env erst nach der Verdopplung des Zeitintervalls zwischen der Immunisierung und der Belastungsinfektion mit FV von drei auf sechs Wochen einen sehr guten Schutz gegen die FV-Infektion vermitteln. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine verbesserte Antikörperantwort zurückzuführen, da die B-Zellen mehr Zeit für ihre Reifung hatten. Die Immunisierung mit MCMV.env schützte die geimpften Mäuse außerdem langfristig gegen eine FV-Infektion, wie ein Langzeitversuch über drei Monate zeigen konnte.

Transferexperimente, bei denen CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺-depletierte Immunzellen und Antikörper-haltiges Serum von MCMV.env geimpften Mäusen einen Tag vor der

FV-Infektion transferiert wurden, konnten keinen Schutz übertragen; wie der Schutz vermittelt wird müssen also weitere Experimente zeigen.

In dieser Arbeit konnte durch die Kombination von LG + Env mit verschiedenen Zytokinen die Immunsuppression durch F-MuLV Env überwunden werden und durch den Einsatz MCMV-basierter Vektoren konnte ein sehr guter Schutz der immunisierten Mäuse gegen eine FV-Infektion vermittelt werden.

6.1 Summary

The suppression of immune responses to a simultaneously applied immunogen by retroviral Env represents a challenging problem in antiretroviral vaccine development. Therefore, DNA vaccines expressing F-MuLV Env and Leader-Gag were combined with cytokine-encoding plasmids in the FV model. The co-immunization with cytokine-encoding plasmids alleviated the suppressive effect of Env on the induction of Gag_{L85-93}-specific CD8⁺ T cells, especially the combination LG + Env with the cytokines IL2, IL12, IL21, IL28A and GM-CSF induced potent specific CD8⁺ T cell responses. The immunizations resulted in lower spleen weights, as well as in reduced viral loads in the spleen after FV infection. GM-CSF positively modulated the induction of binding antibodies; all other cytokines had no influence on the formation of binding antibodies. The co-administration of cytokines could be a solution to the problem of immunosuppression by Env not only in the FV model, but also in immunizations against HIV since, for example, the immunosuppressive domain is highly conserved between different retroviruses.

Not only the immunosuppression by retroviruses is a challenge in the development of vaccines against retroviral infections, but also the induction of complex immune responses. In pre-clinical studies, a vaccine based on RhCMV expressing SIV proteins induced the best protection against the HIV related SIV infection. To evaluate CMV-based immunization in the FV model, MCMV-based vectors expressing Leader-Gag, Leader-Gag_{C1K} or F-MuLV Env have been tested. The homologous prime-boost immunization with MCMV.Leader-Gag or MCMV.Leader-Gag_{C1K} did not induce any Gag_{L85-93}-specific CD8⁺ T cell responses and did not confer any protection against FV infection. MCMV.env induced strong Env₁₂₃₋₁₄₁-specific CD4⁺ T cell responses. However, MCMV.env was able to mediate protection from FV infection only after doubling the time interval between immunization and the FV infection from three to six weeks. This effect is probably due to an improved antibody response because of improved B cell maturation. Furthermore, the immunization with MCMV.env protects the vaccinated mice for a long time against a FV infection, as a long-term experiment over three months could show. Transfer experiments in which CD4⁺ T cells, CD4⁺-depleted immune cells, and antibody-containing serum were transferred from MCMV.env-vaccinated mice one day before the FV infection did not confer protection. In this work, the use of MCMV-based vectors provided a very good protection of the immunized mice against FV infection, but how the protection is mediated must be shown by further experiments.

In this work, the combination of LG + Env with different cytokines was able to overcome the immunosuppression by F-MuLV Env and the use of MCMV-based vectors conferred very good protection of the immunized mice against FV infection.

Literaturverzeichnis

1. Ahlers, J.D., I.M. Belyakov, and J.A. Berzofsky, *Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines*. Curr Mol Med, 2003. **3**(3): p. 285-301.
2. Ahlers, J.D., et al., *Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3947-58.
3. Althaus, C.L. and R.J. De Boer, *Dynamics of immune escape during HIV/SIV infection*. PLoS Comput Biol, 2008. **4**(7): p. e1000103.
4. Altman, J.D., et al., *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes*. Science, 1996. **274**(5284): p. 94-6.
5. Auten, M.W., et al., *CD40 ligand enhances immunogenicity of vector-based vaccines in immunocompetent and CD4+ T cell deficient individuals*. Vaccine, 2012. **30**(17): p. 2768-77.
6. Barcova, M., et al., *gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production*. J Infect Dis, 1998. **177**(4): p. 905-13.
7. Baril, L., et al., *Impact of highly active antiretroviral therapy on onset of Mycobacterium avium complex infection and cytomegalovirus disease in patients with AIDS*. Aids, 2000. **14**(16): p. 2593-6.
8. Barouch, D.H., *Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1*. Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(5): p. 386-90.
9. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. 1983. Rev Invest Clin, 2004. **56**(2): p. 126-9.
10. Bayer, W., et al., *Evaluation of the Friend Virus model for the development of improved adenovirus-vectored anti-retroviral vaccination strategies*. Vaccine, 2008. **26**(5): p. 716-26.
11. Bayer, W., et al., *Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection*. J Virol, 2010. **84**(4): p. 1967-76.
12. Beran, J., *Bivalent inactivated hepatitis A and recombinant hepatitis B vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(6): p. 891-902.
13. Bertini, R., et al., *Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1783-9.
14. Berzofsky, J.A., et al., *Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 450-62.
15. Bevan, M.J., *Helping the CD8(+) T-cell response*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 595-602.
16. Bongard, N., et al., *Interference of retroviral envelope with vaccine-induced CD8+ T cell responses is relieved by co-administration of cytokine-encoding vectors*. Retrovirology, 2017. **14**(1): p. 28.
17. Boulougoura, A. and I. Sereti, *HIV infection and immune activation: the role of coinfections*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 191-200.
18. Browning, J., et al., *Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14637-41.

19. Burton, D.R., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson, *Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 14943-8.
20. Burwitz, B.J., et al., *Cross-Species Rhesus Cytomegalovirus Infection of Cynomolgus Macaques*. PLoS Pathog, 2016. **12**(11): p. e1006014.
21. Cahyadi, A. *GANCICLOVIR FOR NEONATAL HEPATITIS CYTOMEGALOVIRUS (CMV)* 2010 05.09.2010; Available from: <http://andimblitar.blogspot.de/2010/09/ganciclovir-for-neonatal-hepatitis.html>.
22. Canali, E., et al., *A high-performance thioredoxin-based scaffold for peptide immunogen construction: proof-of-concept testing with a human papillomavirus epitope*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4729.
23. Chen, W., et al., *Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7773-82.
24. Chesebro, B., et al., *Characterization of mouse monoclonal antibodies specific for Friend murine leukemia virus-induced erythroleukemia cells: friend-specific and FMR-specific antigens*. Virology, 1981. **112**(1): p. 131-44.
25. Chesebro, B., et al., *Antibody-induced modulation of Friend virus cell surface antigens decreases virus production by persistent erythroleukemia cells: influence of the Rfv-3 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(11): p. 5784-8.
26. Cox, M.A., S.M. Kahan, and A.J. Zajac, *Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love*. Virology, 2013. **435**(1): p. 157-69.
27. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
28. Dale, C.J., et al., *Prime-boost strategies in DNA vaccines*. Methods Mol Med, 2006. **127**: p. 171-97.
29. Deeks, S.G., et al., *Towards an HIV cure: a global scientific strategy*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 607-14.
30. Denner, J., *The transmembrane proteins contribute to immunodeficiencies induced by HIV-1 and other retroviruses*. Aids, 2014. **28**(8): p. 1081-90.
31. Denner, J., et al., *Modulation of cytokine release and gene expression by the immunosuppressive domain of gp41 of HIV-1*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55199.
32. Dietze, K.K., et al., *Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(6): p. 2420-5.
33. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
34. Dittmer, U., D.M. Brooks, and K.J. Hasenkrug, *Characterization of a live-attenuated retroviral vaccine demonstrates protection via immune mechanisms*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6554-8.
35. Dittmer, U., D.M. Brooks, and K.J. Hasenkrug, *Protection against establishment of retroviral persistence by vaccination with a live attenuated virus*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 3753-7.
36. Dittmer, U., D.M. Brooks, and K.J. Hasenkrug, *Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 189-93.
37. Dittmer, U., T. Werner, and A.R. Kraft, *Co-immunization of mice with a retroviral DNA vaccine and GITRL-encoding plasmid augments vaccine-induced protection against retrovirus infection*. Viral Immunol, 2008. **21**(4): p. 459-67.
38. Donnarumma, T., et al., *Opposing Development of Cytotoxic and Follicular Helper CD4 T Cells Controlled by the TCF-1-Bcl6 Nexus*. Cell Rep, 2016. **17**(6): p. 1571-1583.

39. Draper, S.J. and J.L. Heeney, *Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 62-73.
40. Duppach, J., et al., *Expanded regulatory T cells in chronically friend retrovirus-infected mice suppress immunity to a murine cytomegalovirus superinfection*. J Virol, 2014. **88**(23): p. 13892-6.
41. Egli, A., et al., *The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections*. Emerg Microbes Infect, 2014. **3**(7): p. e51.
42. Francois, S., et al., *NK cells improve control of friend virus infection in mice persistently infected with murine cytomegalovirus*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 58.
43. Friend, C., *Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia*. J Exp Med, 1957. **105**(4): p. 307-18.
44. Gibson, W., *Structure and formation of the cytomegalovirus virion*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 187-204.
45. Godel, P., et al., *Modification of one epitope-flanking amino acid allows for the induction of friend retrovirus-specific CD8+ T cells by Adenovirus-based immunization*. J Virol, 2012. **86**(22): p. 12422-5.
46. Gona, P., et al., *Incidence of opportunistic and other infections in HIV-infected children in the HAART era*. Jama, 2006. **296**(3): p. 292-300.
47. Hadzopoulou-Cladaras, M., et al., *The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1265-74.
48. Hansen, S.G., et al., *Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 523-7.
49. Hansen, S.G., et al., *Immune clearance of highly pathogenic SIV infection*. Nature, 2013. **502**(7469): p. 100-4.
50. Hansen, S.G., et al., *Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms*. Science, 2013. **340**(6135): p. 1237874.
51. Hansen, S.G., et al., *Broadly targeted CD8(+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex E*. Science, 2016. **351**(6274): p. 714-20.
52. Hasenkrug, K.J., *Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6468-73.
53. Hasenkrug, K.J., D.M. Brooks, and B. Chesebro, *Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10492-5.
54. Hasenkrug, K.J., D.M. Brooks, and U. Dittmer, *Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6559-64.
55. Hasenkrug, K.J. and B. Chesebro, *Immunity to retroviral infection: the Friend virus model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 7811-6.
56. Hasenkrug, K.J. and U. Dittmer, *The Role of CD4 and CD8 T Cells in Recovery and Protection from Retroviral Infection: Lessons from the Friend Virus Model*. Virology, 2000. **272**(2): p. 244-249.
57. Haynes, B.F., et al., *Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial*. N Engl J Med, 2012. **366**(14): p. 1275-86.
58. Homman-Loudiyi, M., et al., *Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3191-203.
59. Isaacson, M.K., L.K. Juckem, and T. Compton, *Virus entry and innate immune activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 85-100.

60. Iwashiro, M., et al., *CD4(+) T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent friend retrovirus infection*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 52-60.
61. Janeway CA, T.P., Walport M, Shlomchik M, *Immunologie*. Vol. 5. Auflage. 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
62. Jarrett, W.F., et al., *A VIRUS-LIKE PARTICLE ASSOCIATED WITH LEUKEMIA (LYMPHOSARCOMA)*. Nature, 1964. **202**: p. 567-9.
63. Joedicke, J.J., et al., *The phenotype and activation status of regulatory T cells during Friend retrovirus infection*. Virol Sin, 2014. **29**(1): p. 48-60.
64. Johnston, M.I. and A.S. Fauci, *An HIV vaccine--challenges and prospects*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 888-90.
65. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
66. Kalams, S.A., et al., *Safety and comparative immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine in combination with plasmid interleukin 12 and impact of intramuscular electroporation for delivery*. J Infect Dis, 2013. **208**(5): p. 818-29.
67. Kaulfuss, M., et al., *Induction of complex immune responses and strong protection against retrovirus challenge by adenovirus-based immunization depends on the order of vaccine delivery*. Retrovirology, 2017. **14**(1): p. 8.
68. Kenneson, A. and M.J. Cannon, *Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection*. Rev Med Virol, 2007. **17**(4): p. 253-76.
69. Kinter, A., et al., *Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3390-5.
70. Klenerman, P., V. Cerundolo, and P.R. Dunbar, *Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 263-72.
71. Knuschke, T., et al., *Prophylactic and therapeutic vaccination with a nanoparticle-based peptide vaccine induces efficient protective immunity during acute and chronic retroviral infection*. Nanomedicine, 2014. **10**(8): p. 1787-98.
72. Lietz, R., et al., *Codelivery of the chemokine CCL3 by an adenovirus-based vaccine improves protection from retrovirus infection*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1706-16.
73. Lodoen, M.B. and L.L. Lanier, *Viral modulation of NK cell immunity*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(1): p. 59-69.
74. Lu, S., *Heterologous Prime-Boost Vaccination*. Current opinion in immunology, 2009. **21**(3): p. 346-351.
75. Malouli, D., et al., *Reevaluation of the coding potential and proteomic analysis of the BAC-derived rhesus cytomegalovirus strain 68-I*. J Virol, 2012. **86**(17): p. 8959-73.
76. Marthas, M.L., et al., *Efficacy of live-attenuated and whole-inactivated simian immunodeficiency virus vaccines against vaginal challenge with virulent SIV*. J Med Primatol, 1992. **21**(2-3): p. 99-107.
77. McElrath, M.J., et al., *HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis*. Lancet, 2008. **372**(9653): p. 1894-1905.
78. McMichael, A.J. and L.J. Picker, *Unusual antigen presentation offers new insight into HIV vaccine design*. Curr Opin Immunol, 2017. **46**: p. 75-81.
79. McVail, J.C., *Cow-Pox and Small-Pox: Jenner, Woodville, and Pearson*. Br Med J, 1896. **1**(1847): p. 1271-6.
80. Messer, R.J., et al., *Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12260-5.
81. Messer, R.J., K.J. Lavender, and K.J. Hasenkrug, *Mice of the resistant H-2(b) haplotype mount broad CD4(+) T cell responses against 9 distinct Friend virus epitopes*. Virology, 2014. **456-457**: p. 139-44.

82. Messerle, M., et al., *Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14759-63.
83. Michaels, S.H., R. Clark, and P. Kissinger, *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 1998. **339**(6): p. 405-6.
84. Miyazawa, M., et al., *Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development*. J Immunol, 1995. **155**(2): p. 748-58.
85. Morozov, V.A., et al., *Single mutations in the transmembrane envelope protein abrogate the immunosuppressive property of HIV-1*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 67.
86. Muhle, M., et al., *The immunosuppressive domain of the transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1 binds to human monocytes and B cells*. Immunol Res, 2016. **64**(3): p. 721-9.
87. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
88. Munks, M.W., et al., *Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3760-6.
89. Munks, M.W., et al., *Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7235-41.
90. Murray, S.E., et al., *Fibroblast-adapted human CMV vaccines elicit predominantly conventional CD8 T cell responses in humans*. J Exp Med, 2017. **214**(7): p. 1889-1899.
91. Nair, S.R., et al., *Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 440-51.
92. Ney, P.A. and A.D. D'Andrea, *Friend erythroleukemia revisited*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3675-80.
93. Nielsen, M., et al., *The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage*. Immunogenetics, 2005. **57**(1-2): p. 33-41.
94. Nohria, A. and R.H. Rubin, *Cytokines as potential vaccine adjuvants*. Biotherapy, 1994. **7**(3-4): p. 261-9.
95. Ohs, I., et al., *Interleukin-encoding adenoviral vectors as genetic adjuvant for vaccination against retroviral infection*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82528.
96. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
97. Pantophlet, R., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 envelope spike of primary viruses can suppress antibody access to variable regions*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1649-59.
98. Peters, W., et al., *Oral administration of an adenovirus vector encoding both an avian influenza A hemagglutinin and a TLR3 ligand induces antigen specific granzyme B and IFN-gamma T cell responses in humans*. Vaccine, 2013. **31**(13): p. 1752-8.
99. Pike, R., et al., *Race between retroviral spread and CD4+ T-cell response determines the outcome of acute Friend virus infection*. J Virol, 2009. **83**(21): p. 11211-22.
100. Ploquin, M.J., U. Eksmond, and G. Kassiotis, *B cells and TCR avidity determine distinct functions of CD4+ T cells in retroviral infection*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3321-30.
101. Rattay, S., et al., *The Canonical Immediate Early 3 Gene Product pIE611 of Mouse Cytomegalovirus Is Dispensable for Viral Replication but Mediates Transcriptional*

- and Posttranscriptional Regulation of Viral Gene Products*. J Virol, 2015. **89**(16): p. 8590-8.
102. Rawlinson, W.D., H.E. Farrell, and B.G. Barrell, *Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8833-49.
 103. Robb, M.L., *HIV vaccine development: past, present and future*. IDrugs, 2010. **13**(12): p. 852-6.
 104. Robertson, M.N., et al., *Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murine leukemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting*. J Virol Methods, 1991. **34**(3): p. 255-71.
 105. Robertson, S.J., et al., *Suppression of acute anti-friend virus CD8+ T-cell responses by coinfection with lactate dehydrogenase-elevating virus*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 408-18.
 106. Robertson, S.J., et al., *In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3342-9.
 107. Roos, A.K., et al., *Optimization of skin electroporation in mice to increase tolerability of DNA vaccine delivery to patients*. Mol Ther, 2009. **17**(9): p. 1637-42.
 108. Rous, P., *A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl)*. 1910. Clin Orthop Relat Res, 1993(289): p. 3-8.
 109. Rubbert-Roth, A.B.G. *Pathophysiologie der HIV Infektion*. 2011 29.12.2011 [cited 2017 27.07.2017]; Available from: <https://hivbuch.de/2011/12/29/3-pathophysiologie-der-hiv-infektion/>.
 110. Sabarth, N., et al., *Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model*. Vaccine, 2010. **28**(3): p. 650-6.
 111. Santiago, M.L., et al., *Apobec3 encodes Rfv3, a gene influencing neutralizing antibody control of retrovirus infection*. Science, 2008. **321**(5894): p. 1343-6.
 112. Schluns, K.S. and L. Lefrancois, *Cytokine control of memory T-cell development and survival*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 269-79.
 113. Smith, L.M., et al., *Laboratory strains of murine cytomegalovirus are genetically similar to but phenotypically distinct from wild strains of virus*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6689-96.
 114. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, *Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target*. Immunology, 2008. **124**(1): p. 13-22.
 115. Super, H.J., et al., *Requirement for CD4(+) T cells in the Friend murine retrovirus neutralizing antibody response: evidence for functional T cells in genetic low-recovery mice*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9400-3.
 116. Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt, *Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 136-48.
 117. Tan, B.H., *Cytomegalovirus Treatment*. Curr Treat Options Infect Dis, 2014. **6**(3): p. 256-270.
 118. Tenbusch, M., et al., *Coexpression of GM-CSF and antigen in DNA prime-adenoviral vector boost immunization enhances polyfunctional CD8+ T cell responses, whereas expression of GM-CSF antigen fusion protein induces autoimmunity*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 13.
 119. The Biology, P. *Treatment - The replication cycle of HIV* 2000 3.4.2000; Available from: <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/treatment.html>.
 120. Thompson, A.L. and H.F. Staats, *Cytokines: the future of intranasal vaccine adjuvants*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 289597.

-
121. Tischler, B.K., G.A. Smith, and N. Osterrieder, *En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system*. Methods Mol Biol, 2010. **634**: p. 421-30.
 122. Virgin, H.W. and B.D. Walker, *Immunology and the elusive AIDS vaccine*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 224-31.
 123. Wada, H., et al., *T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12557-61.
 124. Weller, T.H., J.B. Hanshaw, and D.E. Scott, *Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease*. Virology, 1960. **12**: p. 130-2.
 125. Whitney, J.B. and R.M. Ruprecht, *Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(1): p. 17-26.
 126. WHO. *HIV/AIDS Data and statistics*. 2015 [cited 2017 01.08.2017]; Available from: <http://www.who.int/hiv/data/en/>.
 127. Wilson, J.M., *Adenoviruses as gene-delivery vehicles*. N Engl J Med, 1996. **334**(18): p. 1185-7.
 128. Wong, J.L., et al., *IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8+ T cells to the tumor microenvironment*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4653-62.
 129. Yu, Y., A.J. Clippinger, and J.C. Alwine, *Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection*. Trends Microbiol, 2011. **19**(7): p. 360-7.
 130. Zelinskyy, G., et al., *The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3199-207.
 131. Zelinskyy, G., et al., *Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection*. Eur J Immunol, 2006. **36**(10): p. 2658-70.
 132. Zelinskyy, G., et al., *CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10619-26.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Proviralet Genomaufbau und Struktur von HIV-1. Modifiziert nach [109]. | 2 |
| Abbildung 2: Infektionszyklus von HIV-1. Modifiziert nach [119]. | 3 |
| Abbildung 3: Die proviralen Genome des FV-Komplexes. | 5 |
| Abbildung 4: Struktur von CMV. Modifiziert nach [21] | 8 |
| Abbildung 5 MCH I-Tetramer. | 43 |
| Abbildung 6: DNA-Immunisierungsschema. | 45 |
| Abbildung 7: Induktion von GagL ₈₅₋₉₃ -spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen. | 46 |
| Abbildung 8: IFN γ -Produktion induzierter CD8 ⁺ T-Zellen. | 47 |
| Abbildung 9: Bindende Antikörper nach DNA-Vakzinierung. | 48 |
| Abbildung 10: Milzgrößen nach Ko-Immunisierung mit Zytokinvektoren. | 49 |
| Abbildung 11: Milzgewichte nach Ko-Immunisierung mit Zytokinvektoren. | 49 |
| Abbildung 12: Viruslasten nach Ko-Immunisierung mit Zytokinvektoren. | 50 |
| Abbildung 13: Milzgrößen nach der Immunisierung mit Zytokinvektoren. | 51 |
| Abbildung 14: Milzgewichte und Viruslasten nach der Immunisierung mit Zytokinvektoren. | 51 |
| Abbildung 15: Insertion von heterologen Genen in das MCMV Genom mit Hilfe von Flp/FRT-vermittelter Rekombination in DH10B. | 53 |
| Abbildung 16: MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag _{CIK} Immunisierungsschema. ... | 55 |
| Abbildung 17: Induktion von GagL ₈₅₋₉₃ -spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach der ersten und zweiten Immunisierung. | 55 |
| Abbildung 18: Induktion von IFN γ in GagL ₈₅₋₉₃ -spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen. | 56 |
| Abbildung 19: Induktion von IFN γ nach der Stimulation mit MCMV-Peptiden. | 57 |
| Abbildung 20: Kategorisierte Milzgrößen nach der Prime/Boost-Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leadergag _{CIK} . | 58 |
| Abbildung 21: Milzgewichte und Viruslasten nach der Immunisierung mit MCMV.Leader-Gag und MCMV.Leader-Gag _{CIK} . | 58 |
| Abbildung 22: Schema der einmaligen Impfung mit MCMV.env. | 59 |
| Abbildung 23: Env-spezifische CD4 ⁺ T-Zellantworten nach einmaliger Immunisierung. | 60 |
| Abbildung 24: MCMV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellantworten. | 60 |
| Abbildung 25: Antikörpertiter nach einmaliger Immunisierung mit MCMV.env. | 61 |
| Abbildung 26: Neutralisierende Antikörpertiter an Tag 10 nach der FV Belastungsinfektion. | 62 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 27: Kategorisierte Milzgrößen nach der Immunisierung mit MCMV.env. | 63 |
| Abbildung 28: Milzgewichte nach der Immunisierung mit MCMV.env. | 63 |
| Abbildung 29: Viruslasten im Plasma und in den Milzen MCMV.env-vakzinierter Mäuse... | 64 |
| Abbildung 30: Immunisierungsschema II mit MCMV.env. | 65 |
| Abbildung 31: Env-spezifische CD4 ⁺ T-Zellantworten nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env. | 65 |
| Abbildung 32: Einfluss der MCMV.env Prime-Boost-Applikation auf die MCMV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellantworten. | 66 |
| Abbildung 33: Bindende Antikörper nach Prime-Boost Immunisierung mit MCMV.env. | 68 |
| Abbildung 34: Neutralisierende Antikörpertiter an Tag 10 nach der FV Belastungsinfektion. | 69 |
| Abbildung 35: Kategorisierte Milzgrößen nach der Prime-Boost Immunisierung mit MCMV.env. | 70 |
| Abbildung 36: Milzgewichte nach der Prime-Boost-Immunisierung mit MCMV.env. | 71 |
| Abbildung 37: Viruslasten im Plasma und in den Milzen MCMV.env-vakzinierter Mäuse... | 72 |
| Abbildung 38: Immunantworten und Viruslasten nach dem Transfer von Zellen oder Serum. | 73 |
| Abbildung 39: Immunisierungsschema des Langzeitversuchs mit MCMV.env. | 74 |
| Abbildung 40: Env-spezifische CD4 ⁺ T-Zellantworten im Langzeitversuch mit MCMV.env. | 74 |
| Abbildung 41: MCMV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellantworten nach zwei verschiedenen Stimulationen. | 75 |
| Abbildung 42: Bindende Antikörper im Langzeitversuch mit MCMV.env. | 76 |
| Abbildung 43: Neutralisierende Antikörpertiter an Tag 10 nach der FV Belastungsinfektion. | 77 |
| Abbildung 44: Kategorisierte Milzgrößen im Langzeitversuch mit MCMV.env. | 78 |
| Abbildung 45: Milzgewichte an Tag 21 im Langzeitversuch mit MCMV.env. | 78 |
| Abbildung 46: Viruslasten im Langzeitversuch mit MCMV.env. | 79 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: PCR Ansatz | 31 |
| Tabelle 2: PCR Ansatz | 31 |
| Tabelle 3: Ligationsansatz..... | 33 |
| Tabelle 4: Gel Zusammensetzung für SDS-PAGE | 36 |
| Tabelle 5: Elektroporationsprotokoll modifiziert nach Roos <i>et al.</i> [107]. | 39 |
| Tabelle 6: Herstellung von MCMV.Leader-Gag und MCMV-Leader-Gag _{C1K} | 53 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| <i>A.dest</i> | destilliertes Wasser |
| AF 700 | Alexa Fluor 700 |
| AIDS | <i>Acquired Immune deficiency syndrome</i> |
| AK | Antikörper |
| α m | <i>anti-mouse</i> |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| Ca^{2+} | Calcium |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CMV | Cytomegalievirus |
| C-Terminus / terminal | carboxy-Terminus / terminal |
| CTL | Zytotoxische T-Lymphozyten |
| d.h. | das heißt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | 2-Desoxyribonukleotid-5-Triphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eF450 | eFluor 450 |
| eF605 | eFluor 605 |
| eF710 | eFluor 710 |
| ELISA | Enzym-verknüpfter Immunosorbent-Assay |
| Env | <i>Envelope glycoprotein</i> |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie |
| FBS | fötales Rinderserum |
| FFU | <i>Focus forming units</i> |
| F-MuLV | Murines Friend Leukämievirus |
| Foxp3 | <i>Forkhead box protein 3</i> |

| | |
|------------------|---|
| FSH | follikelstimulierendes Hormon |
| FV | Friend Virus |
| g | Gramm |
| GagL | <i>leader</i> Epitop des Friend Virus |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| h | Stunde |
| HAART | <i>Highly active antiretroviral therapy</i> |
| HCMV | Humanes Cytomegalievirus |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HIV | Humanes Immundefizienzvirus |
| IC | <i>infectious center</i> |
| ICS | <i>intracellular cytokine staining</i> |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| i.p. | intraperitoneal |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDA | Kilodalton |
| l | Liter |
| M | Molarität (mol/l) |
| MCMV | Murines Cytomegalievirus |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| mg | Milligramm |
| Mg ²⁺ | Magnesium |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| μ | Mikro (10 ⁻⁶) |
| μl | Mikroliter (10 ⁻⁶ l) |
| μM | μM Mikromolar (10 ⁻⁶ M) |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| mV | Millivolt |
| n | Nano |
| NK | Natürliche Killerzellen |

| | |
|-----------------------|---|
| Nt | Nukleotide |
| N-Terminus / terminal | Amino-Terminus / terminal |
| OD | Optische Dichte |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| Pe-Cy7 | Phycoerythrin-Cyanin 7 |
| Per-CP | Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex |
| PFU | <i>Plaque-forming units</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SFFU | <i>Spleen focus-forming units</i> |
| SFFV | <i>Spleen focus-forming virus</i> |
| SIV | Simianes Immundefizienzvirus |
| TCID ₅₀ | <i>Tissue Culture Infection Dose 50</i> |
| TE | Tris-EDTA |
| Tet | Tetramer |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| T _H | T-Helferzelle |
| T _{reg} | Regulatorische T-Zelle |
| TM | Transmembrandomäne |
| U | Unit |
| U.a. | Unter anderem |
| üN | Über Nacht |
| U.U. | Unter Umständen |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| vp | virale Partikel |

| | |
|-------|---------------------|
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| Wt | Wildtyp |
| (w/v) | Masse pro Volumen |

Danksagung

Ich möchte zu allererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf Dittmer für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und seine stets anregenden Ideen danken.

Meiner Betreuerin Dr. Wibke Bayer gilt besonderer Dank für die sehr gute Einarbeitung, ihre unermessliche Geduld und ihre guten Ratschläge und Anregungen. Sie gab mir die Freiheit, das Thema umzusetzen und eigene Ideen einzubringen.

Ich möchte auch Prof. Dr. Mirko Trilling und der AG Trilling für die große Hilfe bei der Realisierung und Umsetzung der MCMV-Versuche danken. Mein besonderer Dank gilt auch der „BAC-Mama“ Meike Rückborn für ihre Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem Sonja Windmann und Camilla Hrycak für die Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen, das tolle Arbeitsklima und die vielen Gespräche und Kochevents abseits des Laboralltags.

Auch der AG Dittmer und der AG Sutter möchte ich sehr für die vielen Ideen während unserer Seminare und für die Weitergabe ihres Wissens und ihrer Erfahrungen danken.

Meinen Büromitbewohnern danke ich für die vielen unterhaltsamen Gespräche und die außergewöhnlichen Ideen, falls wir doch mal eine Alternative zum Labor brauchen.

Ich möchte mich auch bei Daniela Catrini und Ursula Schrammel für ihr großartiges Organisationstalent bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne die diese Ausbildung niemals möglich gewesen wäre und die immer an mich geglaubt hat. Ich danke auch all meinen Freunden, die auch meine schlechten Tage tapfer ertragen haben und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema Entwicklung von „Vektor-basierenden Impfstrategien für die prophylaktische Immunisierung im Friend-Retrovirus-Modell“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nadine Bongard befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Prof. Dr. Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Nadine Bongard

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Nadine Bongard

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.